

*Exiguobacterium* sp. RB3  $\alpha$ -amylaasin ja *Bacillus*  
endo- $\beta$ -1,4-glukanaasin puhdistus ja  
karakterisointi ja niiden vaikutus kauran  
ravintokuituvalmisteen viskositeettiin

Pro Gradu

Edvard Partti

Helsingin yliopisto

Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta

Biotieteiden laitos

Biokemian ja biotekniikan osasto, HEBIOT-koulutusohjelma

Toukokuu 2018

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme Biotekniikan koulutusohjelma (HEBIOT)	
Tekijä – Författare – Author Edvard Partti			
Työn nimi – Arbetets titel – Title <i>Exiguobacterium</i> sp. RB3 $\alpha$ -amylaasin ja <i>Bacillus</i> endo- $\beta$ -1,4-glukanaasin puhdistus ja karakterisointi ja niiden vaikutus kauran ravintokuituvalmisteen viskositeettiin			
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track Biotekniikka			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro Gradu		Aika – Datum – Month and year Toukokuu 2018	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 79 + liitteet 3 s.

Tiivistelmä – Referat – Abstract

Kaurapohjaiset elintarvikkeet ovat terveellisiä. Monet niiden terveyshyödyt johtuvat kauran liukoisen ravintokuidun suuresta  $\beta$ -glukaanipitoisuudesta.  $\beta$ -glukaanin terveysvaikutukset ovat riippuvaisia sen molekyylipainosta ja viskositeetista. Viskositeetilla on myös muuta merkitystä kaurapohjaisissa elintarvikkeissa kuten kaurajugurteissa ja kauramaidoissa. Aiemmassa Folaafibre-tutkimusprojektissa oli tutkittu kaurakuidun folaattipitoisuuden (B9 vitamiini) kasvattamista fermentoimalla sitä eri mikrobeilla. Hyvin folaattia tuottaneet mikrobit myös alensivat kaurakuituvalmisteen viskositeettia, ja erittivät glykosyylihydrolaaseja ja/tai proteaasia. Oli kuitenkin jäänyt epäselväksi, olivatko entsyymit ainut syy viskositeetin alenemiseen, ja kuinka paljon kullakin niistä oli vaikutusta viskositeettiin. Lisäksi tämän alan kirjallisuudessa on pidetty epäselvänä, onko esim. tärkkelyksen ja  $\beta$ -glukaanin välillä jotain interaktioita jotka mm. nostavat niiden viskositeettia yli yksittäisten polymeerien viskositeetin summan. Näitä voitaisiin selvittää puhdistamalla viskositeettia alentaneista mikrobikannoista kyseiset entsyymit ja tutkimalla niiden vaikutusta kaurakuidun viskositeettiin. Yhdeksi mikrobiksi valittiin *Exiguobacterium sp.* RB3 kanta, koska em. syiden lisäksi tässä bakteerisuvussa esiintyy psykrofilejä ja mikrobeja jotka voivat kasvaa korkeassa pH:ssa, jolloin sen erittämät entsyymit saattaisivat olla aktiivisia matalissa lämpötiloissa ja korkeassa pH:ssa, ja olla siten teollisesti kiinnostavia. Toiseksi mikrobiksi valittiin *Bacillus sp.* ABM5119, koska sitä oli käytetty monissa Folaafibre-projektin tutkimuksissa.

Työn tavoitteena oli puhdistaa *Bacillus sp.* ABM5119:n endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi, ja *Exiguobacterium sp.* RB3:n  $\alpha$ -amylaasi ainakin siinä määrin, että ne ovat muista endoaktiivisista glykosyylihydrolaaseista ja proteaaseista puhtaita, ja sitten mitata puhdistettuja entsyymejä ja proteaasia käyttäen niiden vaikutus yhdessä ja erikseen keitetyn kaurakuituvalmisteen viskositeettiin. Lisäksi tavoitteena oli karakterisoida *Exiguobacterium sp.* RB3 amylaasin olennaisimmat biokemialliset ominaisuudet, sekvensoida sen geenin amylaasia koodaava alue, ja selittää sen ominaisuuksia myös sekvenssistä johdettavissa olevan tiedon perusteella.

*Bacillus sp.* ABM5119:n endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi puhdistettiin noin 90 % puhtaaksi käyttäen DEAE-anioninvaihtokromatografiaa ja ammoniumsulfaattisaostusta. *Exiguobacterium sp.* RB3:n  $\alpha$ -amylaasi puhdistettiin muista glykosyylihydrolaaseista ja proteaasista puhtaaksi käyttäen DEAE-anioninvaihtokromatografiaa, ja sulfopropyliktioninvaihtokromatografiaa. Lisäksi sen puhdistuksen yhteydessä saatiin pieni määrä proteaasia käyttäen ammoniumsulfaattisaostusta. *Exiguobacterium sp.* RB3:n amylaasia koodaava geenin DNA monistettiin PCR:llä ja sekvensoitiin. Sekvenssin perusteella tehtiin tietokantahaut, ja Robetta-serveriä käyttäen mallinnettiin amylaasi-proteiinin kolmiulotteinen rakenne. Entsyymeillä hydrolysoitujen kaurakuitupreparaattien viskositeetit mitattiin rotaatioviskosimetrillä leikkausnopeusalueelta 0,3 – 100 1/s.

Keitetyn kaurakuitupreparaatin viskositeettia alentavat eniten  $\alpha$ -amylaasi ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi. Proteaasi ei vaikuta kaurakuitupreparaatin viskositeettiin, kun kuitupreparaatti on keitetty. Endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi alentaa viskositeettia yhtä hyvin kuin  $\beta$ -1,3-1,4-glukanaasi. Synergiaa viskositeetin alentamisessa  $\alpha$ -amylaasilla ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasilla ei havaittu, mutta havaittiin että  $\beta$ -glukaani saattaa estää tärkkelyksen retrogradaatiota. Hyvin pienetkin entsyymiaktiivisuudet vaikuttavat viskositeettiin. Jos halutaan  $\beta$ -glukaanin viskositeetin ja siten terveysvaikutusten säilyvän, täytyy esim. kauramaidon valmistuksessa käytettävien entsyymivalmisteiden olla  $\beta$ -glukanaaseista hyvin puhtaita. Mikrobifermentaatioissa tapahtuvat viskositeetin alenemat johtuvat lähinnä mikrobien erittämistä glykosyylihydrolaaseista, ei niinkään esim. niiden metabolian sivutuotteista kuten happiradikaaleista. *Exiguobacterium sp.* RB3  $\alpha$ -amylaasi on rakenteeltaan *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylaasin kaltainen glykosyylihydrolaasiryhmän 13 entsyymi. Se sitoo rakenteeseensa kolme kalsiumiatomia, ja kalsiumpitoisuus vaikuttaa sen aktiivisuuteen. Se on aktiivisimmillan pH alueella 5,0 – 7,5. Se sietää detergenttejä, toisin kuin eräs aiemmin karakterisoitu *Exiguobacterium*- $\alpha$ -amylaasi. RB3  $\alpha$ -amylaasin turnover number oli korkea, 29000 1/s. *Exiguobacterium*-suvun psykrofiilisessä haarassa esiintyy kahta eri  $\alpha$ -amylaasia, joista yksi on tässä karakterisoitu, ja toinen on selvästi erilainen rakenteeltaan ja biokemiallisilta ominaisuuksiltaan.

Avainsanat – Nyckelord – Keywords

Kaura,  $\beta$ -glukaani, ravintokuitu, tärkkelys, *Exiguobacterium*,  $\alpha$ -amylaasi, endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi, proteaasi, viskositeetti

Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors

Matti Korhola ja Suvi Taira

Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited

Biokemian ja biotekniikan osasto

Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information

# Sisällys

Lyhenneluettelo.....	7
Johdanto .....	7
Kaurapohjaiset elintarvikkeet ovat trendikkäitä ja terveellisiä.....	7
Kaurakuitupreparaatin folaattipitoisuutta voidaan kasvattaa fermentoimalla se mikrobeilla, mutta tällöin viskositeetti laskee.....	8
Juoman tai jugurtin tyyppisissä viljapohjaisissa elintarvikkeissa viskositeetillä on merkitystä .....	8
Liukoinen ravintokuitu koostuu $\beta$ -glukaanista ja arabinoksylaanista jotka nostavat viskositeettia.....	9
Tässä työssä käytettävän kaurakuituvalmisteen koostumus.....	9
Tärkkelys .....	10
$\beta$ -glukaani.....	10
Arabinoksylaani.....	12
Viskositeetti .....	12
Aiemmissä tutkimuksissa glykosyylihydrolaasit ja proteaasi ovat alentaneet viljojen polysakkaridipreparaattien viskositeettia, mutta entsyymien välinen synergia on epäselvä.....	14
Glykosyylihydrolaasien rakenne ja katalysimekanismi.....	16
Endo- $\beta$ -1,4-glukanaasit hajottavat $\beta$ -glukaaneja ja niiden rakenne on TIM-tyyppinen kaltainen.....	19
$\alpha$ -amylaasien rakenteessa on kolme domeenia.....	20
<i>Exiguobacterium</i> -sukuun kuuluu psykrofilejä ja ne erittävät entsyymejä jotka voivat olla teollisesti kiinnostavia.....	23
Työn tavoitteet ja suorituspaikka .....	24
Materiaalit ja Menetelmät.....	24
Kaurakuitu ja kasvatusalustat.....	24
Mikrobit.....	24
Kaupalliset entsyymipreparaatit.....	24
Entsyymiaktiivisuuksien ja proteiinipitoisuuden määrittäykset.....	25
Kaupallisen pesuaineen käsittely amylaasin detergenttistabiilisuuskoea varten.....	26
SDS-PAGE ja tsmografiat .....	26
Entsyymien tuottokasvatukset mikrobeilla.....	26

Kasvatusten supernatanttien, ja muiden proteiinipreparaattien konsentroinnit ja pesut.....	27
DEAE-Trisacryl anioninvaihtokromatografiat.....	27
HiTrap sulfopropyyl kationinvaihtokromatografia.....	27
Ammoniumsulfaattisaostus.....	27
Entsyymien vaikutus kaurakuituvellin viskositeettiin .....	28
Kromosomaalisen DNA:n eristys bakteereista.....	28
<i>Exiguobacterium</i> RB3 amylaasin geenin alukkeiden suunnittelu ja PCR.....	28
Sekvensoitavan plasmidin konstruktio.....	29
<i>Exiguobacterium</i> sp. RB3 amylaasigeenin sekvensointi.....	30
Aminohapposekvenssien haku ja linjaus.....	30
<i>Exiguobacterium</i> sp. RB3 amylaasin rakenteen laskennallinen mallinnus .....	31
Tulokset.....	31
<i>Bacillus</i> sp. ABM5119 kannasta saatiin puhdistettua endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi kahdella puhdistusvaiheella.....	31
DEAE-Trisacryl anioninvaihtokromatografia .....	32
Ammoniumsulfaattisaostuksessa päästiin eroon lopuistakin kontaminanteista.....	33
<i>Exiguobacterium</i> sp. RB3 kannasta onnistuttiin puhdistamaan sekä $\alpha$ -amylaasi että proteaasi .....	35
DEAE-kromatografia.....	35
Ammoniumsulfaattisaostuksen pilottikokeesta saatiin proteaasia.....	36
HiTrap sulfopropyyl (SP) -kationinvaihtokromatografiassa $\alpha$ -amylaasi puhdistui.....	37
<i>Exiguobacterium</i> sp. RB3 $\alpha$ -amylaasin turnover number eli $k_{cat}$ vakio.....	39
$\alpha$ -amylaasi on aktiivisimmillaan pH:ssa 5 – 7,5.....	40
Kelaattori alentaa $\alpha$ -amylaasin aktiivisuutta ja $\alpha$ -amylaasi sietää detergenttejä.....	41
Kaurakuituvellin viskositeetikokeisiin käytettyjen entsyymipreparaattien aktiivisuudet.....	42
$\alpha$ -amylaasi alentaa kaurakuituvellin viskositeettia eniten, endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi myös, mutta proteaasi ei ollenkaan.....	45
<i>Exiguobacterium</i> sp. RB3 kannan $\alpha$ -amylaasigeenin PCR-monistus, kloonaus ja sekvensointi onnistuivat.....	51
$\alpha$ -amylaasin aminohapposekvenssi on erilainen kuin aiemmin karakterisoiduilla <i>Exiguobacterium</i> amylaaseilla.....	52
<i>Exiguobacterium</i> ja muiden $\alpha$ -amylaasien aminohapposekvenssien linjaus tuo esiin katalyyttiset ja kalsiumeja sitovat aminohapot.....	53
RB3 $\alpha$ -amylaasin homologiamallinnettu rakenne on samanlainen kuin <i>B. licheniformis</i> $\alpha$ -amylaasilla.....	55
Tulosten tarkastelu.....	60

Endo- $\beta$ -1,4-glukanaasin puhdistaminen <i>Bacillus sp.</i> ABM5119 kannasta onnistui vain kahdella puhdistusvaiheella..	60
$\alpha$ -amylaasin puhdistus <i>Exiguobacterium sp.</i> RB3 kannasta onnistui riittävän hyvin ja sivutuotteena saatiin puhdas proteaasi .....	62
<i>Exiguobacterium sp.</i> RB3 $\alpha$ -amylaasin turnover number eli $k_{cat}$ vakio saattaa olla poikkeuksellisen suuri.....	64
RB3 kannan $\alpha$ -amylaasi on neutraalissa pH:ssa aktiivinen.....	64
RB3 $\alpha$ -amylaasin SDS:n ja pesuainedetergenttien toleranssi on kohtalainen .....	65
<i>Exiguobacterium sp.</i> RB3 kannan $\alpha$ -amylaasi on sekvenssiltään samanlainen kuin psykrofiilissä <i>Exiguobacterium</i> -lajeissa esiintyvät $\alpha$ -amylaasisekvenssit.....	66
<i>Exiguobacterium</i> $\alpha$ -amylaasien mallit vaikuttavat tarkoilta.....	66
<i>Exiguobacterium sp.</i> RB3 ja DAU5 kantojen $\alpha$ -amylaasit ovat rakenteeltaan samanlaisia kuin <i>Bacillus licheniformis</i> $\alpha$ -amylaasi.....	67
<i>Exiguobacterium</i> RB3 $\alpha$ -amylaasin kofaktorina on kalsiumioneja kuten amylaaseissa yleensäkin .....	67
<i>Exiguobacterium sp.</i> SH3 $\alpha$ -amylaasin rakenne eroaa RB3 ja DAU5 $\alpha$ -amylaasien rakenteista .....	68
Kaupalliset entsyymipreparaatit sisälsivät useita aktiivisuuksia.....	68
$\alpha$ -amylaasi ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi alensivat kaurakuitupreparaatin viskositeettia, proteaasi ei.....	69
$\beta$ -glukaani saattaa estää tärkkelyksen retrogradaatiota.....	72
Kaurakuidun entsyymihydrolyysikokeiden viskositeettitulokset selittävät aiemmat <i>Bacillus sp.</i> ABM5119 kannan mikrobifermentaatioiden viskositeettitulokset.....	72
Eri polysakkaridien ja siten eri glykosyylihydrolaasien välinen synergia viskositeetin suhteen jäi epäselväksi.....	74
Johtopäätökset.....	75
Kiitokset .....	75
Viihteet.....	75
Liite 1 $\alpha$ -amylaasigeenialukkeiden suunnittelun linjaukset.....	82
Liite 2 RB3 $\alpha$ -amylaasin nukleotidisekvenssi.....	82
Liite 3 digitaalisena säilytettävän tiedon tiedostonimet.....	83

# Lyhenneluettelo

CMC, engl. carboxymethylcellulose, karboksimeetyliselluloosa

CGTaasi, syklodektriiniglukaanitransferaasi, engl. cyclodextrin glucantransferase

DEAE, dietyyliaminoetyyli

DP, engl. degree of polymerisation, polymerisaatioaste

GH, glykosyylihydrolaasi(ryhmä)

EDTA, etyleenidiamiinitetraasetaatti

LDL, engl. low density lipoprotein

HDL, engl. high density lipoprotein

MW, molekyylipaino, engl. molecular weight

MWCO, engl. Molecular Weight Cutoff

PCR, engl. polymerase chain reaction, polymeerasiketjureaktio

PDB, engl. protein data bank

SDS, natriumdodekyylisulfaatti

SDS-PAGE, natriumdodekyylisulfaattipolyakryliamidigeelielektroforeesi

SOF, Swedish Oatfibre OatWell 14 % -kaurakuitupreparaatti

TAE, Tris – asetaatti – EDTA puskuri

## Johdanto

### Kaurapohjaiset elintarvikkeet ovat trendikkäitä ja terveellisiä

Viime vuosina markkinoille on tullut useita uusia kaurasta valmistettuja elintarvikkeita, kuten kauramaitoja, jugurtin kaltaisia tuotteita ja nyhtökaura. Edellämainitut vastaavat vegaanista- tai kasvisruokavaliota noudattavien kuluttajien tarpeisiin korvata eläinperäiset tuotteet kasveista valmistetuilla, kuten lehmänmaito kauramaidolla (Yle uutisten verkkosivut). Toisaalta kauralla on tieteellisesti todistettuja positiivisia terveysvaikutuksia. Eri viljoista kaurassa ja ohrassa on eniten liukoiseen ravintokuituun kuuluvaa  $\beta$ -1,3-1,4-glukaania (Wood ym. 1991), josta tässä työssä käytetään tästä nimitystä  $\beta$ -glukaani, kuten mm. Kivelä ym. (2009) ja Kariluoto ym. (2014) artikkeleissa.  $\beta$ -glukaani alentaa veren sokeri- ja kolesterolipitoisuuksia (Wang & Ellis 2014).  $\beta$ -glukaani lisää sappihappojen eritystä ohutsuoleen, ja kolesterolia alentava vaikutus johtuu siitä, että sappihappojen lisääntynyt erityys kuluttaa rasvoja verestä (Lia ym. 1995).  $\beta$ -glukaani

myös hidastaa tärkkelyksen hajoamista ohutsuolessa (Dhital ym. 2014) ja siten verensokerin nousua aterian jälkeen.  $\beta$ -glukaanin kolesterolia alentavat ja verensokerin tasoa säätelevät ominaisuudet ovat riippuvaisia sen molekyylipainosta ja pitoisuudesta (Lazaridou & Biliaderis 2007, Wang & Ellis 2014). Toisaalta Frank ym. (2004) mukaan hiivaleipään lisätyllä  $\beta$ -glukaanilla oli pääosin samanlainen vaikutus veren HDL-, LDL-kolesteroliin, ja rasvoihin riippumatta sen molekyylipainosta, joten terveysvaikutusten yhteys molekyylipainoon ei ole täysin kiistaton. Terveysshyötyjen takia runsaasti  $\beta$ -glukaania sisältäviä valmisteita lisätään joihinkin elintarvikkeisiin kuten korkean kuitupitoisuuden leipiin (Sibakov 2014). Lihansyönnin vähentämisellä ja ylipäättään kokojyväviljatuotteiden käytön lisäämisellä näyttää olevan tieteellisesti todistettuja positiivisia terveysvaikutuksia. Foerster ym. (2014) mukaan runsaasti kokojyväviljatuotteita sisältävä ruokavalio vaikuttaa suoliston mikrobiflooraan vähentäen liikalihavuutta edistäviä tekijöitä. Runsaasti kokojyväruista sisältävä dieetti laskee LDL-kolesterolin pitoisuutta metabolista oireyhtymää sairastavilla (Magnusdottir ym. 2014). Suurempi kokojyvätuotteiden käyttö laskee painoindeksiä, kokonaiskolesterolia, LDL-kolesterolia, ja paaston insuliniitasoa (McKeown ym. 2002).

## Kaurakuitupreparaatin folaattipitoisuutta voidaan kasvattaa fermentoimalla se mikrobeilla, mutta tällöin viskositeetti laskee

Folaatin, eli B9-vitamiinin, pelkistynyt muoto tetrahydrofolaatti (THF) toimii solun metaboliassa koentsyyminä metyyli-, ja muiden yksihäilisten ryhmien siirrossa (Voet & Voet 2004, 1028). Raskauden aikana naisilla folaatin tarve 2-3 kertaistuu (Partlin ym. 1993). Folaatin puute raskauden aikana johtaa sikiön keskushermoston epämuodostumiin, ja useissa maissa tätä torjutaan lisäämällä folaattia viljatuotteisiin (Bell & Oakley 2009, Arth ym. 2016).

Folafibre-tutkimusprojektissa tavoitteena oli tuottaa folaattia kaurakuitu- ja muihin viljavalmisteisiin fermentoimalla niitä elintarvikeperäisillä bakteereilla ja hiivoilla (Kariluoto ym. 2006, Herranen ym. 2010, Korhola ym. 2014, HY:n TUHAT-sivusto). Folaattia hyvin tuottaneista kannoista *Bacillus sp.* ABM5119 tuotti maljatesteissä amylaasia, endo- $\beta$ -1,4-glukanaasia ja proteaasia, muttei  $\beta$ -1,3-1,4-glukanaasia (Herranen ym. 2010)  $\beta$ -1,3-1,4-glukanaasi on spesifinen liukoiselle  $\beta$ -glukaanille. Muillakin kannoilla havaittiin maljatesteissä solunulkoisia amylaasi-, endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi-, ksylanaasi- ja proteaasiaktiivisuuksia (Herranen ym. 2010, Korhola ym. 2014), joista oletettavasti viskositeetin alenemat johtuvat. Folafibre-projektissa ei tutkittu puhtaiden entsyymien vaikutusta kaura-, tai muun kuitupreparaatin viskositeettiin, vaan useita eri entsyymejä erittävien bakteerien vaikutusta siihen. Siten jäi epäselväksi kunkin yksittäisen entsyymin vaikutus keitetyn kaurakuitupreparaatin viskositeettiin. Toisaalta julkaisemattomista tuloksista ja kirjallisuudesta (Liu ym. 2010) tiedettiin puhtaan amylaasin vähentävän viskositeettia eniten. Mikrobit saattavat hajottaa kuitupreparaatin polysakkarideja ja siten alentaa viskositeettia myös ei-entsyymaattisesti metaboliin sivutuotteina syntyneiden yhdisteiden, kuten happiradikaalien ja vetyperoksidin avulla. Mm. maitohappobakteerit voivat tuottaa vetyperoksidia (Dahiya & Speck 1968, Singh ym. 2018), joka hajottaa polysakkarideja hapettamalla ne (Kivelä ym. 2009). Myös se jäi siis epäselväksi kuinka paljon viskositeetti laskee entsyymien toimesta ja kuinka paljon muista syistä.

## Juoman tai jogurtin tyyppisissä viljapohjaisissa elintarvikkeissa viskositeetillä on merkitystä

Esimerkkeinä kaupallisista tuotteista, joissa viskositeetti on olennaista ja johtuu erilaisista polysakkarideista, tai päinvastaisesti viskositeettia on alennettu entsyymaattisilla hydrolyysikäsittelyillä ovat muun muassa: Yosa (valmistaja Bioferme) ja muut kaurajogurtit (mm. Oatly ja Valio), sekä kauramaidot (valmistajia mm. Juustoportti, Oatly ja Valio).



Yosa on jogurtinomainen kaurasta maitohappobakteereilla fermentoitu välipala. Yosassa ja muissa kaurajogurteissa täytyy olla korkea viskositeetti. Nykyisellään tämä saadaan aikaan lisäämällä tuotteeseen pektiiniä. Kauramaito taas ei saa olla liian viskoosia. Kauramaidon valmistuksessa kaurapreparaatin tärkkelys hajotetaan amylaasilla, jotta viskositeetti laskee (Sibakov 2014). Jos kauramaidossa haluttaisiin säilyttää  $\beta$ -glukaanin terveystuotokset, tulisi käytettävän amylaasivalmisteen olla  $\beta$ -glukanaaseista puhdas.  $\beta$ -glukaani hajoaa myös ei-entsymaattisesti esim. hydroksyyliiradikaalien aiheuttaman hapettumisen johdosta (Kivelä ym. 2009). Hydroksyyliiradikaalien lähde voi olla mm. askorbiinihappo joka molekulaarisella hapella hapettuessaan tuottaa vetyperoksidia, joka lopulta hajoaa tuottaen hydroksyyliiradikaaleja (Kivelä ym. 2009). Siksi ei ole mahdollista lisätä esim. juomatuotteeseen sekä  $\beta$ -glukaania että askorbiinihappoa (C-vitamiini) vaikka tällainen tuote kuulostaisi hyvin terveelliseltä.

## Liukoinen ravintokuitu koostuu $\beta$ -glukaanista ja arabinoksyalaanista jotka nostavat viskositeettia

Suurimman osan ravintokuidusta muodostavat  $\beta$ -glukaani ja arabinoksyalaani (Petersson ym. 2012, Sibakov 2014). Ravintokuitu jaetaan liukoiseen ja liukenemattomaan. Liukoiseen ravintokuituun kuuluvat  $\beta$ -glukaani, ja arabinoksyalaanin liukoinen osa. Liukenemattomaan ravintokuituun kuuluu mm. selluloosa, ja liukenematon arabinoksyalaani.  $\beta$ -glukaanin osuus kauranjyvän kuivapainosta vaihtelee 1,8 – 5,5 % välillä, ollen tyypillisesti välillä 4,5 – 5,5 % riippuen kasvuolosuhteista, ja lajikkeesta (Wang & Ellis, 2014). Kaurassa 2 – 4,5 % kuivapainosta on arabinoksyalaania, mutta vain 0,2 – 0,4 % eli noin kymmenesosa arabinoksyalaanista on liukoista (Sibakov 2014). Viskositeetin aiheuttavat liukoisen ravintokuidun polysakkaridit, eli  $\beta$ -glukaani ja arabinoksyalaani, sekä tärkkelys (joka ei ole ravintokuitua). Siten viskositeetin alenemisen kannalta olennaisia glykosyylihydrolaaseja ovat  $\beta$ -glukanaasit, ksylanaasit ja amylaasit.

## Tässä työssä käytettävän kaurakuituvalmisteen koostumus

Tässä työssä käytettiin kaupallista Swedish Oat Fibre (SOF, jota myöhemmin käytetään preparaatin lyhenteenä) OatWell kaurakuitupreparaattia. Sen koostumus Herranen ym. (2010) mukaan on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1 Swedish Oat Fibre (SOF) OatWell kaurakuituvalmisteen koostumus

	massa-%
<b>proteiinia</b>	21
<b>hiilihydraatteja</b>	34
<b>sokeria*</b>	0
<b>rasvaa</b>	4
<b>tyydyttyynyttä rasvaa</b>	0,9
<b>ravintokuitua</b>	30
<b>beetaglukaanina</b>	14
<b>natriumia</b>	6
<b>kosteus</b>	5

\*tarkoittaa mono- ja disakkarideja. Hiilihydraatteihin sisältyy mm. tärkkelys.

OatWell kaurakuituvalmiste on valmistettu kauran leseestä, joka saadaan myllyssä jyvän kuoren, ja endospermin välisestä subaleuronikerroksesta (Sibakov 2014). OatWell-valmiste on käsitelty saostamalla etanolilla (Girardet & Webster 2011, sit. Sibakov 2014). Etanolisaostuksessa poistuu pienimolekyylisiä yhdisteitä, kuten lipidejä ja monosakkarideja (esim. glukoosi). Valmisteesta huomattava osuus on proteiinia. Suurina pitoisuuksina proteiiniliuoksetkin ovat viskooseja. Lisäksi Liun (2010) tulosten mukaan myös proteaasi alentaa kaurajauholiuoksen viskositeettia. Siksi tässä työssä on otettu huomioon myös proteaasien mahdollinen vaikutus viskositeettiin.

## Tärkkelys

Tärkkelys syntetisoidaan kasvissa lipidikalvon eristämässä amyloplasteissa tärkkelysylväiksi. Se koostuu kahdesta polysakkaridista: amyloosista, ja amylopektiinistä. Amyloosi on melko lineaarinen glukaani, jossa on 99 %  $\alpha$ -1,4-sidoksia ja 1 %  $\alpha$ -1,6-sidoksia. Sen molekyylipaino vaihtelee 100 kDa ja 1 MDa välillä. Polymerisaatioaste (DP, degree of polymerisation) vaihtelee 690 – 5000 välillä, ja yksi amyloosimolekyylisi sisältää 9 – 20 haarautumiskohtaa eli  $\alpha$ -1,6-sidosta. Tällöin yhden haarautumattoman ketjun pituus on 200 – 700 glukoositähdettä (Tester & Karkalas 2002). Ketjujen ei-pelkistyvät päät ovat tärkkelysylväsen pinnalla mahdollistaen sen hajottamisen amylaasilla (Brzozowski & Davies 1997). Amylopektiinin sidoksista noin 5 % on  $\alpha$ -1,6-sidoksia, eli se on huomattavasti amyloosia haaroituneempaa, ja sen molekyylipaino on 10 MDa – 1000 MDa, eli jopa tuhat kertaa suurempi kuin amyloosin (Tester & Karkalas 2002).

Natiivi gelatinisoimaton tärkkelys on liuoksessa kiteisinä partikkeleina, ja se ei ole erityisen viskoosia, paitsi hyvin suurina pitoisuuksina (>40 % w/v). Kuumennettaessa yli 60 °C lämpötilaan tärkkelyksen kiderakenne alkaa hajota, ja tärkkelysylväset turpoavat, ja lopulta hajoavat. Tätä prosessia nimitetään gelatinisaatioksi. Gelatinisaation jälkeen amyloosi on liuoksessa satunnaiskierteenä, ei niinkään oppikirjoissa kuvattuna järjestyneenä kierteenä, jollaisena se esiintyy natiivissa muodossa. Satunnaiskierrerakenteesta johtuen gelatinisoitunut tärkkelys on viskoosia.

Jäähdyttyään gelatinisoitunut tärkkelys retrogradoituu hiljalleen. Amyloosi ja amylopektiini muodostavat uudelleen kaksoiskierteitä, jotka tarttuvat toisiinsa vetysidoksin muodostaen partikkeleita. Tällöin myös viskositeetti menetetään. Amyloosi retrogradoituu amylopektiiniä helpommin koska se on lineaarisempaa.

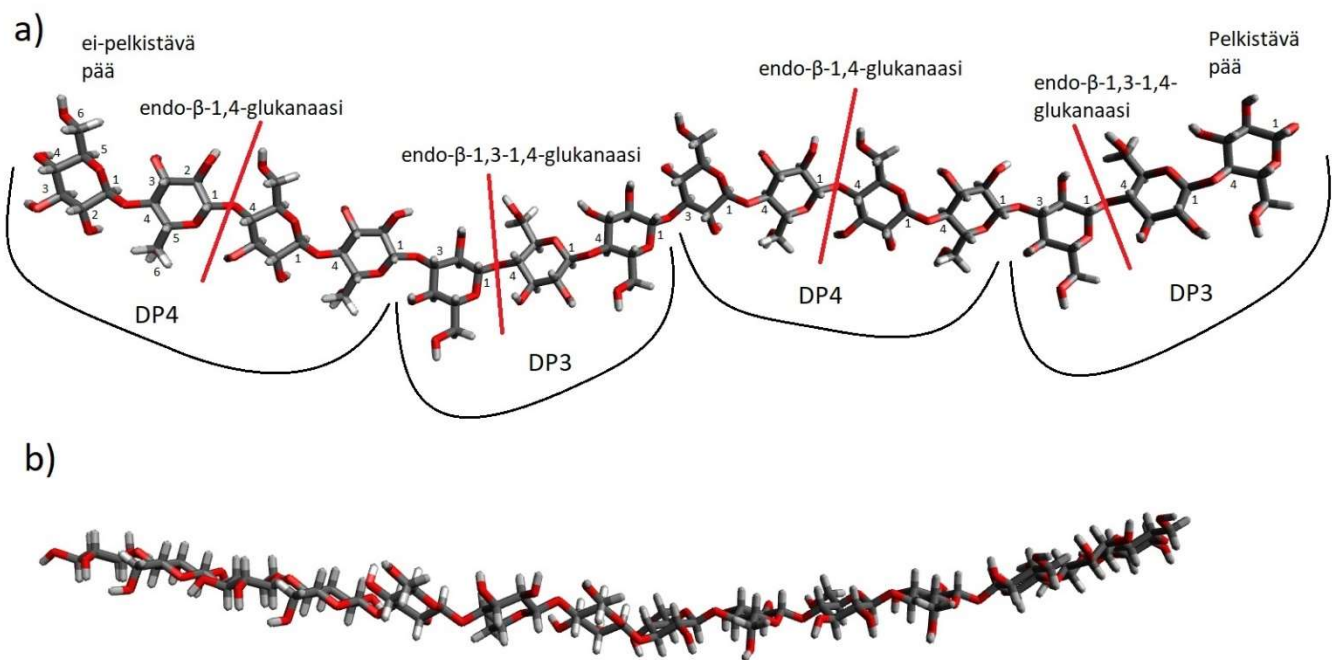
## $\beta$ -glukaani

Kauranjyvässä  $\beta$ -glukaani (eli  $\beta$ -1,3-1,4-glukaani) sijaitsee lähinnä endospermin soluseinissä, ja soluseinät ovat paksuimpia jyvän kuoren alla olevassa subaleuronikerroksessa (Sibakov 2014). Johtuen  $\beta$ -glukaanin konsentroitumisesta lähelle kuorikerrosta sen pitoisuus on suurempi leseessä, ja siitä valmistetuissa tuotteissa, kuin kokojyvätuotteissa (Sibakov 2014). Tämän takia SOF-kaurakuitupreparaatti on valmistettu leseestä.

$\beta$ -glukaania voidaan käyttää elintarvikkeissa terveyshyötyjen aikaansaamisen lisäksi kasvattamaan viskositeettia, ja toisaalta rasvan korvikkeina (Lazaridou & Biliaderis 2007). Korkean  $\beta$ -glukaanipitoisuuden valmisteita on lisätty muroihin, makaroneihin/nuudeleihin, leipään, muffinseihin, ja maitotuotteisiin (Lazaridou & Biliaderis 2007).

$\beta$ -glukaanimolekyylin osa nähdään kuvassa 1 yhdessä mahdollisessa konformaatioissaan (mahdollisia konformaatioita liukoisille poly- ja oligosakkaridimolekyyleille on suuri joukko).  $\beta$ -glukaani on glukoosipolymeeri, jonka glukosidisiokset ovat  $\beta$ -1,3- ja  $\beta$ -1,4-sidoksia. Noin 30 % sidoksista on  $\beta$ -1,3-sidoksia (Wood ym. 1991).  $\beta$ -1,3-sidosten välissä on joko

kolmen tai neljän glukoosin yksikkö, jossa sidokset ovat  $\beta$ -1,4-sidoksia, eli sellotriooisyksikkö (DP3) tai sellotetrooisyksikkö (DP4), kuten kuvassa 1 on havinnollistettu (DP: engl. degree of polymerisation). Vaikka kuvassa 1 on tällaiset vuoron perään, eivät ne esiinny  $\beta$ -glukaanissa järjestyneesti, vaan voi olla vaikkapa kolme sellotriooisyksikköä peräkkäin.  $\beta$ -glukaanin sellotriooisyksiköiden määrän suhde sellotetrooisyksiköiden määrään, eli ns. DP3/DP4-suhde eri viljoissa vaihtelee siten, että se on vehnällä 3,0 – 4,5, ohralla 1,8 – 3,5, rukiilla 1,9 - 3,0 ja pienin kauralla eli 1,5 – 2,3 (Wood ym. 1991, Lazaridou & Biliaderis 2007). Molekyylimallinnuksella on todettu, että  $\beta$ -glukaaniketju jäykistyy, kun DP3/DP4-suhde kasvaa (Li ym. 2012). Kun sellotriooisyksiköitä (DP3) on useita peräkkäin, ne Li ym. (2012) mukaan asettuvat kolmoiskierteen muotoon, joka on jäykempi rakenne.



Kuva 1 Osa  $\beta$ -glukaanimolekyyliä tikkumallina esitettynä. Hiilet tummanharmaalla, vedyt vaaleanharmaalla ja hapet punaisella. a) Kahdesta ensimmäisestä glukoositähteestä on kaikki hiilet numeroitu, ja lopuista glykosididoksiin osallistuvat hiilet. Sellotetrooisyksiköt (DP4) ja sellotriooisyksiköt (DP3) merkitty kaarilla.  $\beta$ -glukanaasientsyymien hydrolysoimat glykosididokset on osoitettu niiden poikki vedetyillä punaisilla viivoilla. b) sama  $\beta$ -glukaanimolekyylin osa käännettynä 90 astetta pitkittäisuuntaisen akselinsa ympäri ja ilman merkintöjä

Kuten kuvasta 1 nähdään,  $\beta$ -1,3-sidokset aiheuttavat  $\beta$ -glukaaniin mutkat, jotka estävät yksittäisiä  $\beta$ -glukaanimolekyyliä muodostamasta keskenään vetysidoksia, ja kiteytymästä siten kuin selluloosa. Siten  $\beta$ -glukaani on liukoista juuri  $\beta$ -1,3-sidoksien ansiosta.  $\beta$ -glukaani sisältää myös selluloosan kaltaisia pelkästään  $\beta$ -1,4-sidoksia sisältäviä osia (Wood ym. 1991), mutta näitä on vain pieni osa polymeeristä, kauran  $\beta$ -glukaanissa tyypillisesti 7-9 % (DP $\geq$ 5) (Lazaridou & Biliaderis 2007). Jos kahden molekyylin selluloosankaltaiset osat muodostavat välilleen vetysidoksia, niin nämä osat saattavat aiheuttaa  $\beta$ -glukaanin aggregoitumisen (Lazaridou & Biliaderis 2007). Aggregoituminen taas laskee viskositeettia (Kivelä ym. 2009).

$\beta$ -glukaanin viskositeetti riippuu sen molekyylipainosta (molecular weight, MW) kuten viskositeetikappaleessa tarkemmin selitetään. Myös  $\beta$ -glukaanin terveystvaikutukset ovat MW:stä riippuvaisia, kuten jo aiemmin todettiin (Lazaridou & Biliaderis 2007, Wang & Ellis 2014). Kauran  $\beta$ -glukaanin molekyylipainoksi on saatu mm. arvoja 1,1 MDa, 1,6 MDa, 2,09 – 2,51 MDa, 1,1 – 1,9 MDa ja 0,647 MDa, (Johansson ym. 2000, Beer ym. 1997a, Beer ym. 1997b, Kim&White 2012). Wang & Ellis (2014) mukaan  $\beta$ -glukaanin MW vaihtelee välillä 2 - 3 MDa kun hajoaminen sen eristyksessä onnistutaan estämään. Molekyyliaino vaihtelee kauralajikkeen, kasvuolosuhteiden, ja uutto- ja puhdistusolosuhteiden mukaan (Wang & Ellis 2014), sekä myös kasvukauden sademäärän mukaan (Kim ja White 2012). Tässä tutkimuksessa käytettävän SOF-kaurakuitupreparaatin  $\beta$ -glukaanin molekyyliaino on keskimäärin 1,4 MDa (Kivelä ym. 2009). Kun glukoositähteen MW on 162 g/mol, niin tästä saadaan, että  $\beta$ -glukaanimolekyylit koostuvat noin 6000 – 15000 glukoositähteestä eli niiden polymerisaatioaste (DP) on 6000-15000. Sellotriooosi- ja sellotetroosiyksiköitä on useita tuhansia.

Tässä tutkimuksessa kaurakuitu keitettiin. Tällöin  $\beta$ -glukaani uuttuu liuokseen, jolloin syntyy viskoosi liuos. Kim ja White (2012) mukaan kuumentaminen ei vaikuta  $\beta$ -glukaanin molekyyliainoon. Useiden päivien tai viikkojen kuluessa  $\beta$ -glukaanimolekyylit liittyvät yhteen muodostaen aggregaatteja, ja liuoksen viskositeetti laskee, koska vapaina olevien molekyylien määrä laskee (Kivelä ym. 2009).

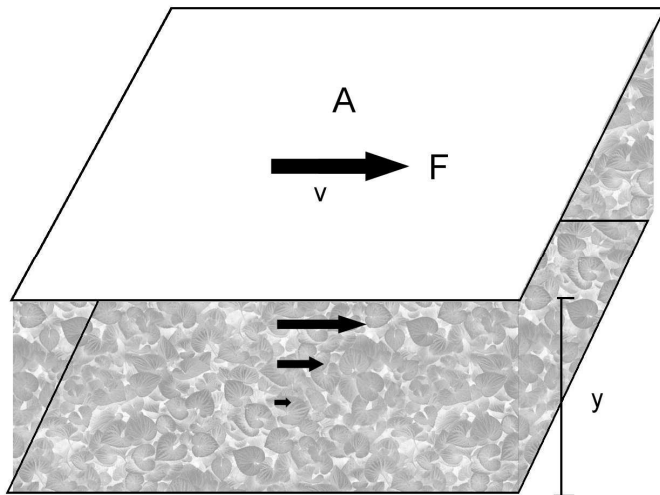
## Arabinoksyylaani

Arabinoksyylaani selkärangan muodostaa  $\beta$ -1,4-sidoksinen ksyloosipolymeeri. Ksyloosien 2' ja 3' hiiliin on liittynyt glykosididoksin arabinoosia sekä glukoosia. Lisäksi osa ksylooseista voi olla asetyloitujia. Kauran arabinoksyylaani on 81% ksyloosia, 10% arabinoosia ja 7,6% glukoosia (Sarbu ym. 2003). Osa arabinoksyylaanista on liukoista, osa liukenematonta. Vain liukoinen arabinoksyylaani nostaa liuoksen viskositeettia. Kuten jo todettu, kaurassa 2 – 4,5 % kuivapainosta on arabinoksyylaania, mutta vain noin kymmenesosa siitä on liukoista (Sibakov 2014). Rukiin arabinoksyylaani on 22-34% liukoista, sen osuuden kuivapainosta ollen 1,3-2,5% (Ragae ym. 2001). Leseessä arabinoksyylaania on koko jyvää enemmän, 4-13 % (Sibakov 2014). Sarbu ym. (2003) mukaan kauran speltistä eristetyn ksyylaani MW vaihteli 68 – 170 kDa välillä eristysolosuhteista riippuen. Ohran akanoista eristetyn ksyylaani MW oli 35 – 45 kDa (Höije ym. 2005). Rukiin arabinoksyylaani MW oli kolmella eri lajikkeella  $495 \pm 24$  kDa,  $280 \pm 19$  kDa, ja  $199 \pm 5$  kDa (Ragae ym. 2001).  $\beta$ -glukaania matalampi molekyyliaino viittaa siihen, että vaikka ksyylaania olisi saman verran kuin  $\beta$ -glukaania, niin sen vaikutus viskositeettiin on vähäisempi. Kaurakuitupreparaatin liukoisten polysakkaridien kuivapainosta 0,5 % on arabinoksyylaania (Kivelä ym. 2009). Siten liukoista ksyylaania on SOF-preparaatissa selvästi vähemmän kuin  $\beta$ -glukaania. Matalamman MW:n ja pitoisuuden perusteella on arvioitu, että liukoinen arabinoksyylaani aiheuttaisi pienimmän osan SOF-kaurakuidun viskositeetista, ja siten puhdasta ksyylaania ei tarvittaisi. Tässä työssä positiivisina kontrolleina käytettävissä teollisuusentsyymipreparaateissa on kuitenkin myös ksyylaania.

## Viskositeetti

Viskositeetti johtuu virtaavan fluidin (eli nesteen tai kaasun) molekyylien ja suurempien partikkelien keskinäisten interaktioiden aiheuttamasta kitkasta (Hautala 2004, s 61-63). Kuvassa 2 on havainnollistettu, millaisella periaatteella viskositeetti voidaan mitata. On kaksi levyä pinta-alaltaan A, joiden välissä on y paksuinen kerros fluidia. Ylempää levyä

vedetään alemman levyn suuntaisesti voimalla  $F$ , jolloin se liikkuu nopeudella  $v$ . Voiman  $F$  suhde pinta-alaan  $A$  on leikkausjännitys  $\tau$ .



**Kuva 2** Viskositeetin mittaus teoriassa

Voima  $F$  riippuu, nopeudesta  $v$ , paksuudesta  $y$ , ja (dynaamisesta) viskositeetista  $\mu$  Newtonin viskositeetilain mukaisesti (Hautala 2004, s 62):

$$\tau = \frac{F}{A} = \mu \frac{v}{y}$$

Josta saadaan viskositeetti  $\mu$ :

$$\mu = \frac{\frac{F}{A}}{\frac{v}{y}}$$

Käytännössä viskositeetti  $\mu$  mitataan siten, että aiheutetaan  $v$  suuruisen nopeus, ja mitataan  $F$  kun  $A$  ja  $y$  ovat tunnettuja. Suure  $v/y$  on leikkausnopeus, ja sen yksikkö on (m/s)/m, eli 1/s. Dynaamisen viskositeetin yksikkö on Pascal · sekunti, eli Pas. Se voidaan johtaa seuraavasti: (N/m<sup>2</sup>)/((m/s)/m) = (N/m<sup>2</sup>)/(1/s), N/m<sup>2</sup> = Pa -> Pa/(1/s) = Pa · s = Pas. Kun dynaaminen viskositeetti jaetaan aineen tiheydellä, saadaan kinemaattinen viskositeetti (Hautala 2004). Tässä työssä ei käytetä sitä, ja sanalla viskositeetti tarkoitetaan aina dynaamista viskositeettia. Useat fluidit, kuten esim. (puhdas) vesi, noudattavat Newtonin viskositeetilakia, eli  $\mu$  on sama leikkausnopeudesta riippumatta, ja niitä kutsutaan Newtonisiksi nesteiksi. Tämä ei kuitenkaan päde useilla elintarvikkeilla, kuten pullataikina ja ketsuppi, eikä tässä työssä keskeisillä polysakkaridien liuksilla. Näillä fluideilla leikkausjännitys (ja siten viskositeetti) riippuu leikkausnopeudesta. Polysakkaridiliuokset, kuten  $\beta$ -glukaani ovat pseudoplastisia, ts. leikkausohenevia (engl. shear thinning), eli niiden viskositeetti ( $\mu$ ) laskee, kun leikkausnopeus nousee (Wood ym. 2000, Tester & Karkalas 2002, Mäkinen ym. 2012). Tämä johtuu siitä, että polysakkaridiketjut sotkeutuvat toisiinsa (Lazaridou & Biliaderis 2007). Polysakkaridiliuokset voivat olla myös tiksotrooppisia eli niiden viskositeetti laskee sekoittamisen seurauksena (Wood ym. 2000). Leikkausnopeusriippuvuuden takia  $\beta$ -glukaanin viskositeetti leikkausnopeuden funktiona usein esitetään

tuplalogaritmoidulla koordinaatistolla (mm. Kivelä ym. 2009, Mäkinen ym. 2012), koska tällöin viskositeetikäyristä muodostuu jokseenkin suoraa. Pseudoplastisuuden takia tämän työn viskositeetitulosissa raportoidaan sekä käyrät että niiltä 10 1/s leikkausnopeudelta otetut arvot. Vaikka jälkimmäiset eivät kerro koko totuutta, niitä helpompi käsitellä mm. tilastollisesti. Leikkausnopeuden lähestyessä nollaa saadaan rajaviskositeetti, joka riippuu lähinnä molekyylipainosta (Lazaridou & Biliaderis 2007). Rajaviskositeetin suhdetta molekyylipainoon tietyllä polymeerillä, liuottimella, ja lämpötilalla kuvaa Mark-Houwinkin yhtälö (Wagner 1985, Wang & Ellis 2014):

$$LVN = K \cdot M^a$$

jossa LVN = rajaviskositeetti, viskositeetti, K ja a kokeellisesti määritettyjä vakioita.

$\beta$ -glukaanin viskositeetti riippuu sen pitoisuudesta, molekyylipainosta (MW, engl. molecular weight) ja lämpötilasta (Yao ym. 2007, Lazaridou & Biliaderis 2007).  $\beta$ -glukaanin massakonsentraation ja MW:n tulon logaritmin ja viskositeetin logaritmin välinen suhde on lineaarinen (Wood ym. 2000). Tästä voidaan johtaa, että pienet muutokset  $\beta$ -glukaanin MW:ssa johtavat suuriin muutoksiin viskositeetissa, ja sama ilmeisesti pätee myös tärkkelyksen kohdalla. Siten glykosyylhydrolaasien, tai ei-entsyymaattisen hydrolyysin, aiheuttama molekyylipainon lasku johtaa viskositeetin laskuun.

**Aiemmissä tutkimuksissa glykosyylhydrolaasit ja proteaasi ovat alentaneet viljojen polysakkaridipreparaattien viskositeettia, mutta entsyymien välinen synergia on epäselvä**

Useita polysakkarideja sisältävien liuosten viskositeetin alenemista eri entsyymeillä on tutkittu. Zhou ym. (2000) mukaan  $\beta$ -1,3-1,4-glukanaasi alensi viskositeettia yhdellä kauralajikkeella 36 - 14 %, ja toisella 12 - 6 %, ja proteaasi K alensi viskositeettia 15 %. Mathlouthi ym. (2002) mukaan  $\beta$ -glukanaasi ja sellulaasilla kontaminoitunut ksylanaasi alensivat viskositeettia merkittävästi kaura- ja muillakin preparaateilla. Kim ja White (2012) mukaan kaurajauhosta tehdyn velliin viskositeetti aleni amyalaasilla 87 %,  $\beta$ -1,3-1,4-glukanaasilla 63 % ja proteaasilla 27 %. Kim ja White (2012) käyttämät entsyymipreparaatit olivat varsin puhtaita (esim. amyalaasissa oli 0,02 %  $\beta$ -1,4-glukanaasiaktiivisuutta sen amyalaasiaktiivisuudesta), kun taas esim. Mathlouthi ym. (2002) preparaateissa oli kontaminaatioita. Liun (2010) tulosten mukaan amyalaasi alensi kaurapreparaattien viskositeettejä noin 80 - 95 %,  $\beta$ -1,3-1,4-glukanaasi noin 50 - 80 %, nämä yhdessä noin 96 - 99 %, ja proteaasi K noin 40 - 60 %. Eri tutkimuksissa saadut tulokset viskositeetin alenemista siis vaihtelevat, mutta yleisesti voidaan todeta, että kun tarkastellaan koko viljapreparaatin viskositeettia (eikä vain siitä eristetyt  $\beta$ -glukaanin), niin amyalaasi vähentää viskositeettia eniten,  $\beta$ -1,3-1,4-glukanaasi tai endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi seuraavaksi eniten, ja proteaasi vähiten. Toisin sanoen, preparaatin viskositeetista suurimman osan aiheuttaa tärkkelys, seuraavaksi eniten  $\beta$ -glukaanin, ja pienimmän osan proteiinit. Osittain tämä johtunee niiden pitoisuuksista sillä Kim ja White (2012) käyttämä jauho sisälsi 51 % tärkkelystä, 7,5 %  $\beta$ -glukaanin ja 13 % proteiinia, ja Zhou ym. (2000) käyttämät jauhot sisälsivät tärkkelystä 51 %,  $\beta$ -glukaanin 4,7 % ja 4,6 % ja proteiinia 19 % ja 11 %. Tässä työssä käytettävän SOF-kaurakuidun koostumus (taulukko 1) eroaa näistä siten, että siinä on vähemmän tärkkelystä ja enemmän  $\beta$ -glukaanin ja proteiinia.

Periaatteessa preparaatista, jossa on useita viskositeettia aiheuttavia polymeerejä, saadaan selville yhden polymeerin osuus viskositeetista mittaamalla yksittäisen entsyymin preparaatille aiheuttama viskositeetin alenema. Tämän lisäksi polymeereilla voi olla jotain yhteisvaikutuksia viskositeettiin, jos niiden välillä on jotain interaktioita. Tällöin useamman entsyymin aiheuttama viskositeetin alenema olisi erisuuri kuin puhtaitten entsyymien yksittäin aiheuttamien viskositeetin

alensemien summa. Interaktioiden mahdollisen vaikutuksen viskositeettiin selvittäminen oli mm. Kim & Whiten (2012) tutkimuksen yksi tarkoitus. Mathlouthi ym. (2002) mukaan  $\beta$ -glukanaasi ja ksylanaasi, joka oli kontaminoitunut  $\beta$ -1,4-glukanaasilla, yhdessä alensivat viskositeettia enemmän kuin jompikumpi yksinään, mutta ei välttämättä siten, että se osoittaisi niillä olevan jotain synergiaa. Kim ja White (2012) eivät raportoisi, että amylaasilla,  $\beta$ -1,3-1,4-glukanaasilla, ja proteaasilla olisi minään kombinaationa synergiaa viskositeetin alentamisessa. Siten näiden tutkimusten viskositeettitulosten perusteella yhteisvaikutusta ei ole. Kim ja White (2012) mukaan heidän kokeissa liukoisen  $\beta$ -glukaanin keskimääräinen (number average) molekyylipaino laski 43% amylaasi-, ja 15 % proteinaasi K -käsittelyillä, ja romahti alle detektorirajan  $\beta$ -1,3-1,4-glukanaasilla, eli laski noin 100 %. Olettaen entsyymit puhtaiksi  $\beta$ -glukaanin molekyylipainon ei pitäisi laskea muulla kuin  $\beta$ -1,3-1,4-glukanaasilla, paitsi jos esim. tärkkelyksen ja  $\beta$ -glukaanin välillä on jotain interaktioita. Kim ja White (2012) mukaan  $\alpha$ -amylaasin ja proteinaasi K:n vaikutukset  $\beta$ -glukaanin molekyylipainoon johtunevat niiden kontaminanttiaktiivisuuksista, vaikka niitä olikin hyvin vähän. Mathlouthi ym. (2002) käyttämissä kaupallisissa preparaateissa oli merkittäviä kontaminaatioita. Koska näiden tulosten perusteella vähäsetkin kontaminantit vaikuttavat viskositeettiin, niin tässä työssä  $\alpha$ -amylaasi ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi puhdistettiin, ja kaupallisista preparaateista selvitettiin mitä ne sisältävät.

Kim ja White (2012) mukaan kuitenkin  $\beta$ -glukaanin sitoo sappihappoja paremmin, kun tärkkelys ja proteiinit on hydrolysoitu. Tämän siis viittaa johonkin interaktioon, ja on ristiriidassa viskositeettimittauksista saadun tuloksen, ettei interaktioita ole, kanssa. Siten on epäselvää, onko tärkkelyksen,  $\beta$ -glukaanin ja viljan proteiinien välillä jotain interaktioita jotka vaikuttavat viskositeettiin, molekyylipainoon tai muihin terveysvaikutusten kannalta olennaisiin ominaisuuksiin. Tässä työssä pyritään selvittämään viskositeetin osalta tätä asiaa.

Kim ja White (2012) mukaan  $\beta$ -glukaanin molekyylipainon alenemisen ja sappihappojen sitomiskokeiden tulosten perusteella näitä kauran komponentteja tulisi tutkia yhdessä, kun arvioidaan kauran terveysvaikutuksia. Siksi tässä työssä käytetään SOF-kaurakuitupreparaattia joka sisältää näitä kaikkia komponentteja.

Liun (2010), ja Kim & Whiten (2012) tuloksissa on se lievä ongelma, että ne on tehty Rapid Visco Analyzer laitteella, jonka mm. lämmittää näytettä mittauksen aikana. Käytetty leikkausnopeus on epäselvä, eikä saada kuvaa viskositeetista sen funktiona, ja siten sen tuottamat käyrät eivät vastaa mm. Mäkinen ym. (2012) ja Kivelä ym. (2009) saamia, tai tässä työssä saatuja, ja niiden vertaileminen on vaikeaa. Vaikka Kim & Whiten (2012) tutkimus muuten on hyvä, niin heidän käyttämäänsä viskosimetriin liittyvät piirteet puoltavat vastaavanlaisen kokeen tekemistä uudelleen käyttäen tavanomaista rotaatioviskosimetriä.

Useissa edellä mainituissa tutkimuksissa on käytetty  $\beta$ -glukaanin hydrolysointiin  $\beta$ -1,3-1,4-glukanaasia. Herranen ym. (2010) mukaan *Bacillus sp.* ABM5119 erittää endo- $\beta$ -1,4-glukanaasia, ei  $\beta$ -1,3-1,4-glukanaasia, mutta Kariluoto ym. (2014) mukaan ABM5119 kanta alentaa  $\beta$ -glukaanin viskositeettia, mikä viittaa siihen, ettei ole väliä onko käytetty entsyymi endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi vai  $\beta$ -1,3-1,4-glukanaasi. Fernandes ym. (2016) tutkivat molempien entsyymien käyttöä ohrasta tehdyn rehun  $\beta$ -glukaanien hajoamisessa broilereiden ruuansulastuskanavassa, ja heidän tuloksiensa mukaan  $\beta$ -1,3-1,4-glukanaasi ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi molemmat alentavat puhdistetun  $\beta$ -1,3-1,4-glukaanin viskositeettia yhtä hyvin. Siten ei pitäisi olla väliä, sillä käytetäänkö  $\beta$ -1,3-1,4-glukanaasia vai endo- $\beta$ -1,4-glukanaasia, mutta tämä työ tulee valaisemaan myös tätä asiaa. Fernandes ym. (2016)  $\beta$ -1,3-1,4-glukaanin aktiivisuus rehupreparaatissa laski puoleen, kun taas endo-

$\beta$ -1,4-glukanaasin laski 15 %:iin, minkä he tulkitsivat johtuvan rehun selluloosan aiheuttamasta inhibitiosta. Nämä  $\beta$ -glukanaasit olivat peräisin *Clostridium thermocellumista*. *Bacillus sp.* ABM5119 endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi todennäköisesti on erilainen entsyymi eikä välttämättä esim. inhiboitu samalla tavalla. Tässä työssä käytettävä kaurakuitupreparaatti sisältää myös selluloosaa, joten jos se inhiboi ABM5119:n endo- $\beta$ -1,4-glukanaasia, niin mahdollinen havaittava viskositeetin alenema on se mikä tapahtuu inhiboivan selluloosan läsnä ollessa.

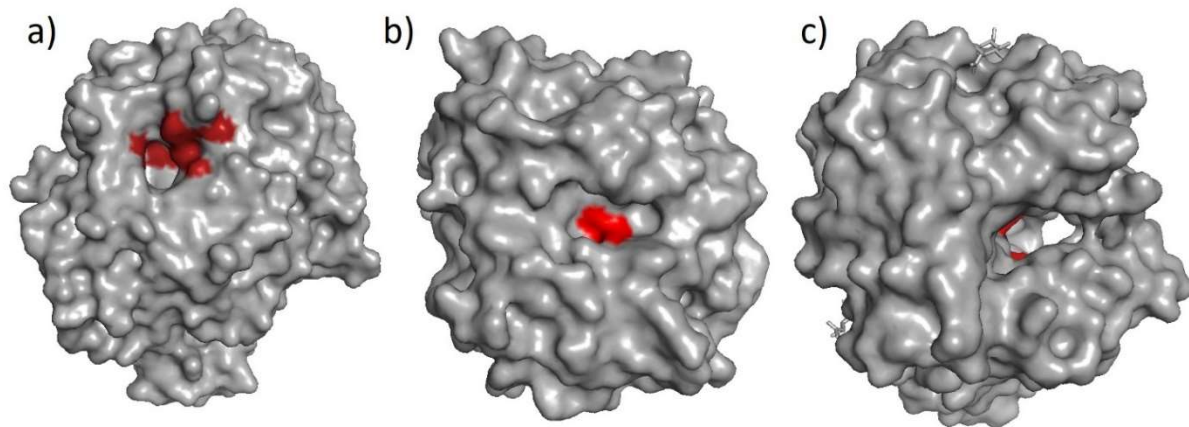
Glykosyylhydrolaaseja ja proteaaseja käytetään elintarviketeollisuudessa. Esim. amylaaseja käytetään leivonnaisten kuoren rapeuttamiseen, ja maltogeenisiä- eli  $\beta$ -amylaaseja käytetään leivän tärkkelyksen retrogradaation estämiseen (engl. anti-staling) paremman maun säilyttämiseksi (Else ym. 2013 patentti US20130059031). Jos esim. käy ilmi, että hyvin pieni määrä endo- $\beta$ -1,4-glukanaasia riittää alentamaan viskositeettia ja siten  $\beta$ -glukaanin molekyyliainoa (mihin Kim & White 2012 tuloksetkin viittaavat), niin mikäli  $\beta$ -glukaanin hajoaminen haluttaisiin estää esim. kauramaidon valmistuksessa, tulisi tähän käytettävien amylaasivalmisteiden olla endo- $\beta$ -1,4-glukanaasista hyvin puhtaita.

Entsyymien lisäksi  $\beta$ -glukaani hydrolysoituu myös hydroksyyliiradikaalien toimesta, jolloin sen viskositeetti alenee (Kivelä ym. 2009, Mäkinen ym. 2012). Mm. jotkin maitohappobakteerit tuottavat vetyperoksidia (Dahiya & Speck 1968, Singh ym. 2018), joka hajoaa muodostaen hydroksyyliiradikaaleja. Myös aerobisessa metaboliassa syntyy sivutuotteena happiradikaaleja. Mm. Kariluoto ym. (2014) tutkimuksessa käytettiin maitohappobakteereja kuitupreparaattien fermentointiin. On epäselvää pääsevätkö hydroksyyliiradikaalit solusta ulos hajottamaan  $\beta$ -glukaania ei-entsyymaattisesti. Yksi kysymys on siis se, johtuuko mikrobifermentaatioissa jokin osa viskositeetin alenemisestä ei-entsyymaattisista syistä, ja tätä voidaan epäsuorasti selvittää tutkimalla entsyymaattisen hajotuksen osuutta viskositeetin alenemasta ja vertaamalla sitä mikrobifermentaatioista saatuihin tuloksiin.

## Glykosyylhydrolaasien rakenne ja katalyysimekanismi

Glykosyylhydrolaasit ovat sokeripolymeerejä tai -oligomeerejä hajottavia entsyymejä. Niissä esiintyy kolme eri aktiivisen kohdan rakennetta: kuoppa, aukko, ja tunneli (Davies & Henrissat 1995). Ne joilla rakenne on kuoppa (kuva 3 a) hajottavat joko disakkarideja tai polysakkaridimolekyylejä niiden päistä (Davies & Henrissat 1995). Ne joilla rakenne on aukko (kuva 3 b) hydrolysoivat sokeripolymeeriä sen keskeltä, eli ovat endoaktiivisia. Näitä ovat mm. endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi,  $\alpha$ -amylaasi, ja ksylanaasi (Davies & Henrissat 1995). Tunnelirakenteiset (kuva 3 c) entsyymit hydrolysoivat molekyyliä prosessiivisesti sen päistä pysyen kiinni hajotettavassa sokeripolymeerissä tunnelimuotonsa ansiosta (Davies & Henrissat 1995). Tällaisia ovat mm. sellobiohydrolaasit. Aktiivisen kohdan muoto siis vastaa funktiota.

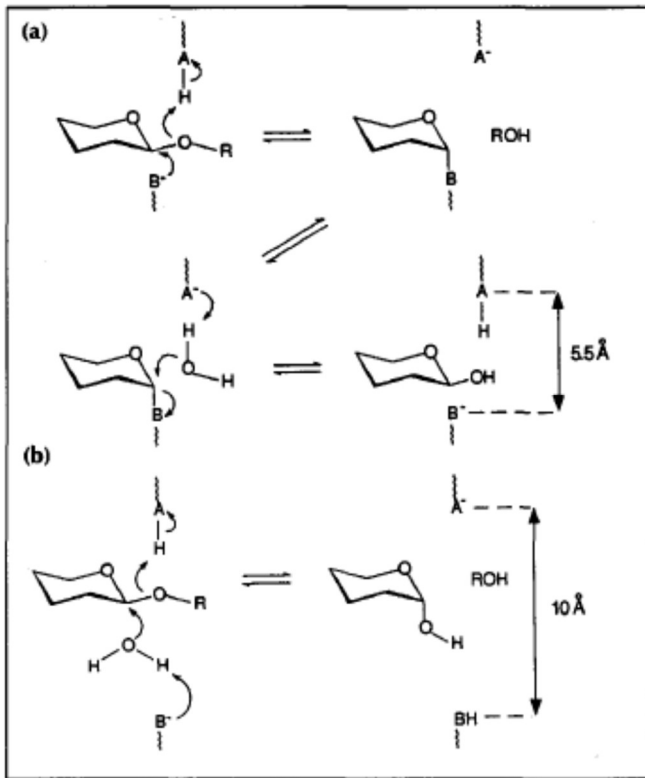




Kuva 3 Esimerkit glykosyylihydrolaasien aktiivisen kohdan kolmesta tyypistä a) kuoppa (*Aspergillus awamori* glukoamylaasi, PDB id 3GLY), b) aukko (*Bacillus subtilis* endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi), c) tunneli (*Trichoderma reesei* sellobiohydrolaasi II). Aktiivista keskusta on väritetty punaisella

Glykosididoksen hydrolysoiminen tapahtuu joko siten, että polymeeristä irtoavan pelkistävän pään sokerin anomeerinen konfiguraatio säilyy samanlaisena (retentio, esim. aksiaalinen  $\rightarrow$  aksiaalinen) tai siten, että se kääntyy päinvastaiseksi (inversio, aksiaalinen  $\rightarrow$  ekvatoriaalinen). Reaktiomekanismi on näissä tapauksissa erilainen.

Anomeerisen konfiguraation samana säilyttävässä retentiomekanismissa entsyymien happokatalyyttinä toimiva sivuketjun karboksyyli-ryhmä luovuttaa protonin glykosididoksen hapelle (kuvassa 4 a ja b merkitty ryhmäksi A). Samanaikaisesti toisen katalyyttisen aminohapon karboksyyli-ryhmän happi tekee nukleofiilisen hyökkäyksen sakkariidin C1 hiileen (kuvan 4 a ensimmäinen reaktio) (Davies & Henrissat 1995). Seurauksena polysakkaridiketjun pelkistävän pään puoleinen ketju (kuvassa 4 ryhmä R) hydrolysoitui irti, ja ei-pelkistävän pään puoleisen ketjun C1-hiilen ja nukleofiilin karboksyyli-ryhmän välille muodostui kovalenttinen sidos (kuvan 4 a ensimmäisen reaktion jälkeinen tilanne) (Davies & Henrissat 1995). Sakkariidin anomeerinen konfiguraatio on tilapäisesti muuttunut päinvastaiseksi kuin alun perin. Kuten kuvan 4 a jälkimmäisessä reaktiossa esitetään, reaktio jatkuu siten, että vetynsä menettänyt happo/emäs katalyytti (kuvassa A<sup>-</sup>, joka on esim. Glu) toimii nyt emäskatalyyttinä vieden vesimolekyyliltä vedyn, jolloin vesimolekyylin happi toimii nukleofiilina liittyen sakkariidin C1-hiileen. Tällöin C1-hiilen ja entsyymien nukleofiilin karboksyyli-ryhmän (ryhmä B) välinen sidos katkeaa sidoselektronin siirtyessä karboksyyli-ryhmän hapelle ja sakkaridi vapautuu entsyymistä (Davies & Henrissat 1995). Jälkimmäisessä reaktiossa sakkariidin anomeerinen konfiguraatio taas vaihtui, ja on nyt siis sama kuin alun perin (Davies & Henrissat 1995).



Kuva 4 Glykosyylihydrolaasien reaktiomekanismit Davies & Henrissat (1995) mukaan, a) retentoiva, b) invertoiva. Lähtötilanteissa sidokset ovat  $\beta$ -glykosidisia sidoksia

Konfiguraation inversion aiheuttavassa mekanismissa ensimmäinen reaktio eroaa yllä kuvatusta siten, että nukleofiilina toimii vesimolekyyli, jonka nukleofilisyyttä lisää emäskatalyyttinä toimiva aminohappo (ryhmä B<sup>-</sup>, esim. Glu), kuten kuvassa 4 b on esitetty (Davies & Henrissat 1995). Tämä aminohappo siis vastaa retentiomekanismin nukleofiilina toimivaa aminohappoa, mutta koska se on kauempana sakkariidista, mahtuu väliin vesimolekyyli. Kuten retentiomekanismissa, glykosidisisidos katkeaa siten, että happokatalyyttinä toimiva aminohappo luovuttaa vedyn glykosidisisidoksen hapelle. Sen katkettua molemmat (poly)sakkariidin päät irtoavat entsyymistä (Davies & Henrissat 1995), eli tässä mekanismissa substraatti ei hetkellisesti liity entsyymiin kovalenttisesti. Lopuksi happo- ja emäskatalyyttien protonaatiotilat palautuvat alkuperäisiksi (ei näytetä kuvassa). Kuten kuvasta 4 b nähdään, niin vesimolekyyli liittyi sakkariidin C1 hiileen eri puolelta, kuin millä glykosidisisidoksen happi oli, jolloin anomeerinen konfiguraatio vaihtui päinvastaiseksi, eli tapahtui inversio (Davies & Henrissat 1995).

Henrissat (1991) on jakanut glykosyylihydrolaasit ryhmiin sekvenssihomologiaan perustuen hydrofobisen klusterianalyysin avulla. Tämä menetelmä kykenee havaitsemaan homologioita evolutiivisesti melko etäällä olevien aminohapposekvenssien välillä. Siten luokittelussa samaan ryhmään kuuluvat ne entsyymit joissa proteiinin laskos on samanlainen, mutta niiden aminohapposekvenssit voivat silti poiketa toisistaan paljonkin. Ryhmiä merkitään lyhenteellä GH(numero) eli esim. GH13. Tietoa eri ryhmien substraattisepsifisyyksistä, rakenteista, ja niihin liittyvistä julkaisuista löytyy <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html> sivustolta. Tässä luokittelussa *Bacillus* suvussa tyypillisesti esiintyvät endo- $\beta$ -1,4-glukanaasit kuuluvat glykosyylihydrolaasiryhmään viisi (GH5) (<http://www.cazy.org/GH5.html>).  $\beta$ -1,3-1,4-glukanaaseja löytyy mm. ryhmästä GH16, joten ne ovat rakenteeltaankin erilaisia.  $\alpha$ -amylaasit kuuluvat

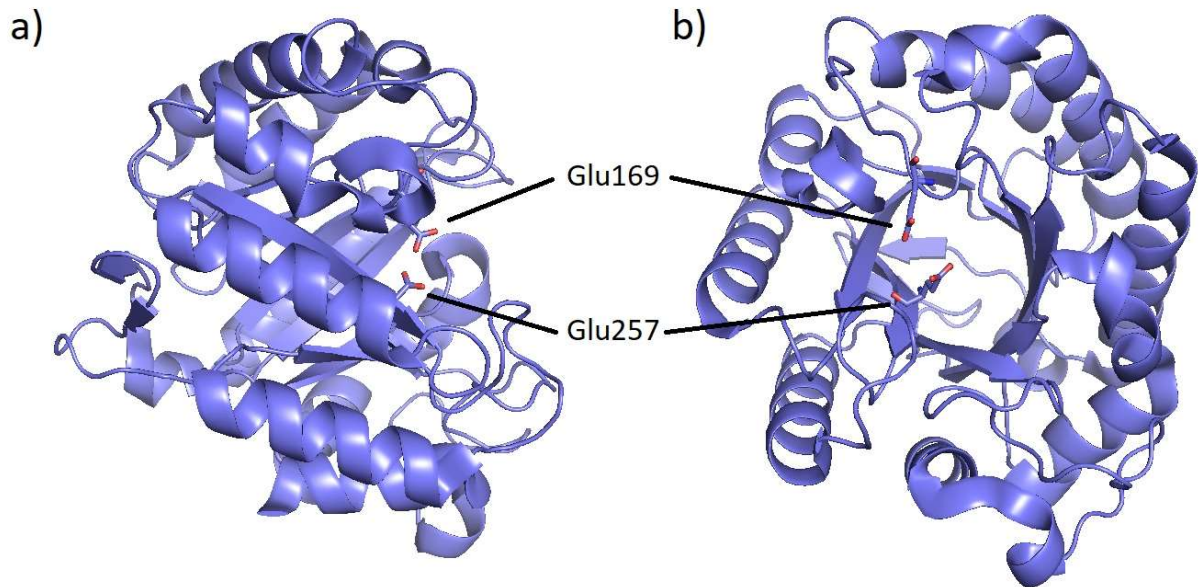
ryhmään 13, ja  $\beta$ -amylaasit ryhmään 14. Siten tässä työssä *Bacillus sp.* ABM5119:stä puhdistettava  $\beta$ -1,4-glukanaasi todennäköisesti kuuluu GH5 ryhmään, ja *Exiguobacterium sp.* RB3  $\alpha$ -amylaasi GH13 ryhmään. Amylaasin osalta tämä selviää sitä koodaavan geenin sekvenssin perusteella.

Substraattispesifisyys perustuu myös aktiivisen kohdan substraattia sitoviin aminohappoihin aktiivisen kohdan muodon (kuoppa, aukko, tunneli) lisäksi. Siten GH5 ryhmä sisältää myös mm. ksylanaaseja,  $\beta$ -glukosidaaseja, ja  $\beta$ -mannosidaaseja (CAZy.org GH5 sivu). Myös GH13 ryhmän kohdalla pätee, että siihen kuuluu eri substraateille spesifisiä hydrolaaseja, kuten  $\alpha$ -glukosidaaseja,  $\alpha$ -1,6-glukosidaaseja, ja pullulanaaseja. GH13 entsyymit on jaettu edelleen alaryhmiin niiden suuren määrän takia (Stam ym. 2006). Toisaalta jos asiaa tarkastellaan lähtemällä liikkeelle substraattispesifisyydestä, niin todetaan, että endo- $\beta$ -1,4-glukanaaseja (EC 3.2.1.4) löytyy ainakin 14:sta eri GH ryhmästä, ja esim. ksylanaaseja 13:sta eri ryhmästä. Siten pelkän aktiivisuutensa perusteella ABM5119 kannan endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi voisi kyllä kuulua muuhunkin ryhmään kuin GH5.

## Endo- $\beta$ -1,4-glukanaasit hajottavat $\beta$ -glukaaneja ja niiden rakenne on TIM-tyynyin kaltainen

Endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi (EC 3.2.1.4) nimensä mukaisesti hydrolysoi  $\beta$ -1,4-sidoksia glukaanien keskeltä. Sen ensisijainen substraatti on selluloosa, jota se hajottaa sen amorfiselta alueelta. Kiteisellä alueella se ei (yksinään) pääse polymeeriin käsiksi. Yleensä endo- $\beta$ -1,4-glukanaaseille sopii substraatiksi myös  $\beta$ -1,3-1,4-glukaani (Fierobe ym. 1993, Mawadza ym. 2000, Santos ym. 2012), vaikka sen  $\beta$ -1,4-sidoksiset osat ovat suurimmaksi osaksi vain kolmen tai neljän glukoositähteen mittaisia, kuten  $\beta$ -glukaanikappaleessa todettiin, ja kuvassa 1 on esitetty. Aktiivisuus laskee oligosakkaridisubstraatin pituuden laskiessa, ja esim. *Clostridium cellulolyticum* endoglukanaasi C:n turnover number -arvot kuuden, viiden, neljän ja kolmen glukoosin substraateilla ovat 4150, 1700, 108 ja 0,65 (Fierobe ym 1993).  $\beta$ -1,3-1,4-glukaanin sellotetroosiyksiköt eivät siis ole optimaalisia substraatteja (ks. kuva 1), mutta endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi hydrolysoi niitäkin.  $\beta$ -1,3-1,4-glukaanin selluloosankaltaiset osat sen sijaan ovat oivallisia substraatteja, tosin niitä on pieni osa koko glukaanimolekyylistä. Kuten kuvasta 1 nähdään,  $\beta$ -1,3-1,4-glukanaasit hydrolysoivat  $\beta$ -glukaania  $\beta$ -1,3-sidoksellisen glukoositähteen pelkistävän pään puoleisesta  $\beta$ -1,4-sidoksesta, eli eri kohdasta kuin  $\beta$ -1,4-glukanaasit. Myös  $\beta$ -1,3-1,4-glukanaasit ovat endoaktiivisia, mutta kun ei ole olemassa ekso- $\beta$ -1,3-1,4-glukanaasia, niin niitä yleensä nimitetään yksinkertaisesti  $\beta$ -1,3-1,4-glukanaaseiksi. Oli entsyymi kumpi tahansa,  $\beta$ -glukaanin hydrolysoinnin seurauksena sen molekyylipaino, ja siten viskositeetti, laskee.

Ne endo- $\beta$ -1,4-glukanaasit, jotka kuuluvat GH5 ryhmään, ovat proteiinin laskokseltaan trioosifosfaatti-isomeraasin (TIM) laskoksen muotoisia. TIM-laskos on hyvin yleinen proteiinin laskos koska jopa 40 % solun entsyymeistä omaa tämän laskoksen (Kuriyan ym. 2012). Laskos muodostuu kahdeksasta  $\beta$ -levy/ $\alpha$ -kierre-motiivista, ja muistuttaa tynnyriä (siksi engl. TIM-barrel fold). Aktiivinen kohta, joka on muodoltaan aukko, sijaitsee tynnyrin toisessa päässä. Nagano ym. (2001) mukaan neljännen  $\beta$ -levyn C-päässä sijaitseva glutamaatti toimii happo/emäs-katalyyttinä, ja seitsemännessä  $\beta$ -levyssä sijaitseva glutamaatti nukleofiilina. Santos ym. (2012) määrittämä *Bacillus subtilis* endoglukanaasin rakenne on esitetty kuvassa 5. Santos ym. mukaan kuvan 5 endoglukanaasissa Glu169 on happo/emäs-katalyytti, ja Glu 257 on nukleofiili. Nämä aminohapot on esitetty kuvassa 5 tikkumalleina.

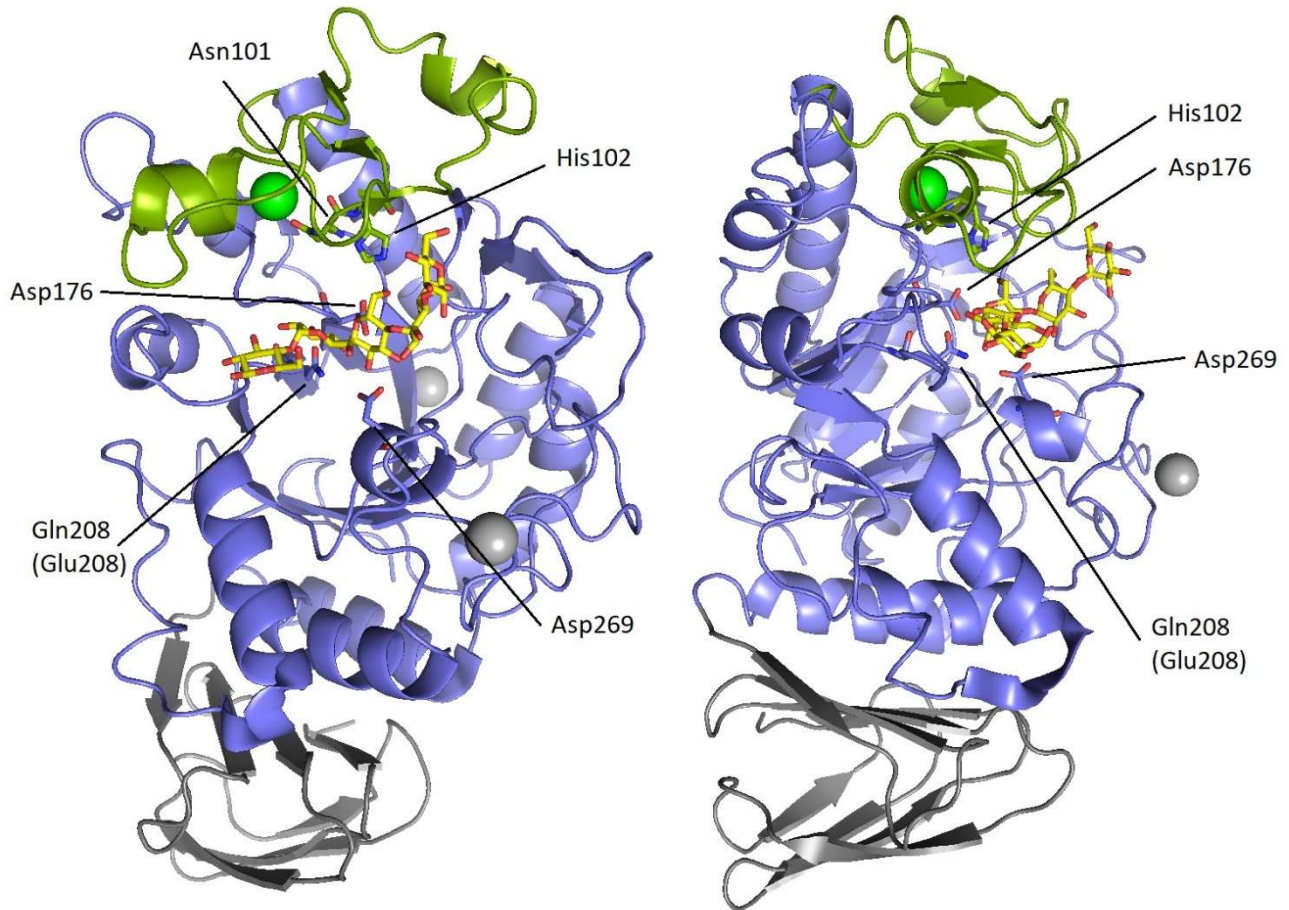


Kuva 5 *Bacillus subtilis* 168 beta-1,4-endoglukanaasin katalyyttinen domeeni kahdesta eri suunnasta. Katalyyttiset aminohapot Glu169 (happo-emäs katalyytti) ja Glu257 (nukleofiili) tikkumalleina (PDB ID: 3PZU, Santos ym. 2012)

### $\alpha$ -amylaasien rakenteessa on kolme domeenia

$\alpha$ -amylaasit hajottavat amyloosia ja amylopektiiniä niiden keskeltä hydrolysoimalla  $\alpha$ -1,4-sidoksia. Hajottamisesta seuraa näiden molekyylien molekyylipainon, ja siten viskositeetin laskua. GH13 ryhmän  $\alpha$ -amylaasiproteiinit muodostuvat kolmesta domeenista joita kutsutaan A, B ja C-domeeneiksi. Kuvassa 6  $\alpha$ -amylaasien rakenteissa domeenit on havainnollistettu sinisellä (A), vihreällä (B) ja harmaalla (C) värillä. A-domeenin laskos on TIM-tynnyri, eli kahdeksan peräkkäisen  $\beta$ -levy/ $\alpha$ -kierre -motiivin laskos (Fujimoto ym. 1998, Stam ym. 2006, Shirai ym. 2007) kuten em. GH5 laskos. Katalyyttiset ja monet substraattia sitovat aminohapot sijaitsevat TIM-tynnyrin betalevyjen C-terminaalaisella puolella (niiden ja alfakierteiden välisissä käännteissä) (Brzozowski & Davies 1997, Fujimoto ym. 1998). A-domeenin kolmannen  $\beta$ -levyn ja kolmannen  $\alpha$ -kierteen väliin on insertoitunut B-domeeni (Fujimoto ym. 1998, Nagano ym. 2001). B-domeenissa on useita substraattia eli tärkkelystä sitovia aminohappoja (Fujimoto ym. 1998, Nagano ym. 2001). Siten A ja B domeenit yhdessä sitovat substraatin ja muodostavat  $\alpha$ -amylaasin katalyyttisen keskuksen. C-domeeni on rakenteeltaan kahdeksan  $\beta$ -levyn muodostama kreikkalaisavainmotiivi (engl. greek key motif) (Brzozowski & Davies 1997, Fujimoto ym. 1998, Machius ym. 1998, Suvd ym. 2001). Ainakin ohran (Bozonnet ym. 2007) ja *Geobacillus thermoleovoransin*  $\alpha$ -amylaaseissa (Mehta & Satyanarayana 2014) sen funktio on sitoa entsyymi tärkkelysjuväsen pintaan.  $\alpha$ -amylaasin katalysimekanismi on retentoiva, ja niiden katalyyttisenä nukleofiilina toimii aspartaatti, joka sijaitsee A-domeenin neljännen  $\beta$ -levyn ja  $\alpha$ -kierteen välissä (Nagano ym. 2001). Happo/emäs-katalyyttinä toimii glutamaatti, joka taas sijaitsee viidennen  $\beta$ -levyn ja  $\alpha$ -kierteen välissä (Nagano ym. 2001). Fujimoto ym. (1998) mukaan *Bacillus subtilis* amylaasissa, jonka rakenne nähdään kuvassa 6, nukleofiili on Asp176, ja Glu208 on happo/emäs katalyytti. Aktiivisuuden kannalta välttämättömän Asp269 funktio on happo/emäs-katalyytin karboksyyli-ryhmän  $pK_a$ -arvon nostaminen muodostamalla siihen vetysidos (Fujimoto ym. 1998, Brzozowski & Davies 1997). Se myös sitoo vetysidoksella substraatin sitä glukoosia, johon ensimmäinen nukleofiilinen substituutioreaktio kohdistuu (Brzozowski & Davies 1997),

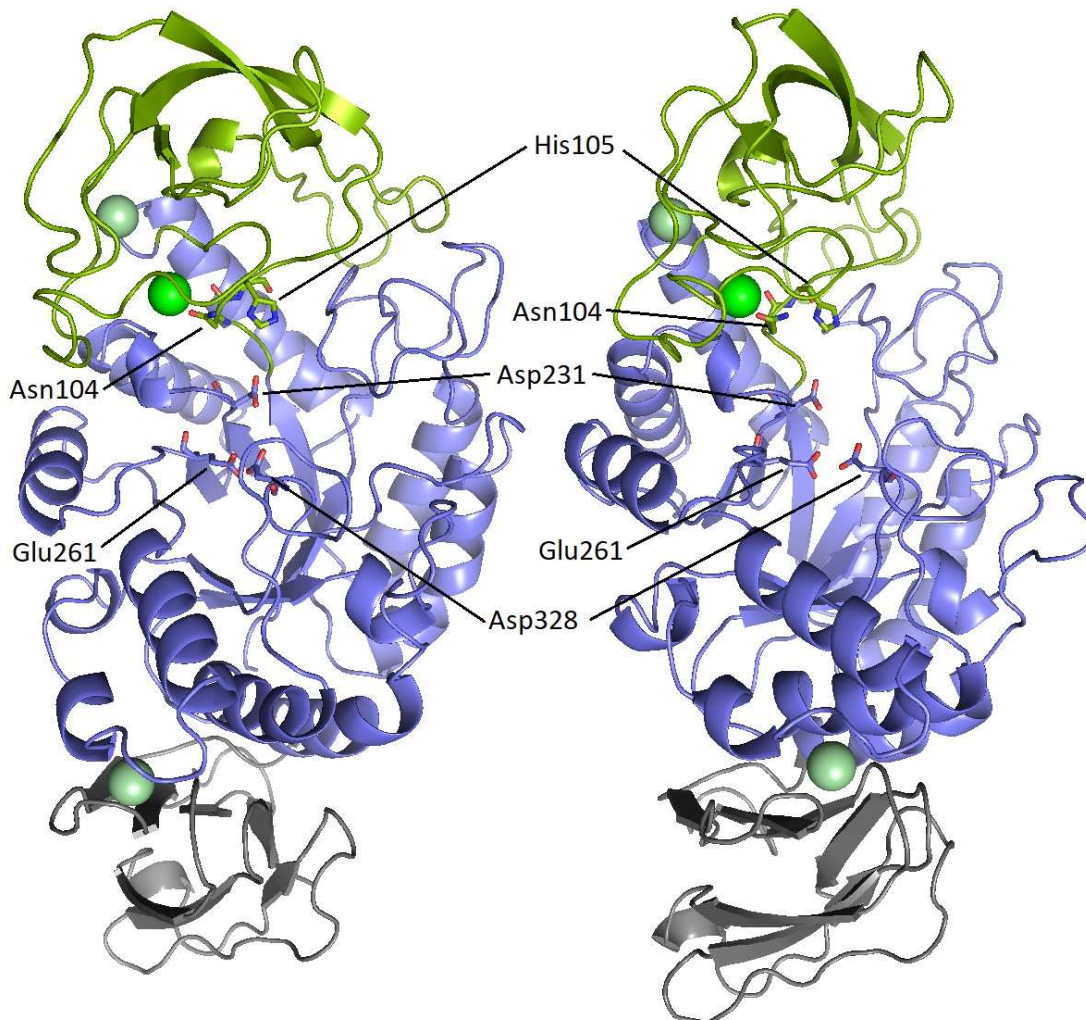
ja on täysin konservoitunut  $\alpha$ -amylaaseissa (Machovic & Janecek 2003). Tosin äskettäin on löydetty  $\alpha$ -amylaasi, jossa tämä aspartaatti on korvautunut histidiinillä (Sarian ym. 2017). Nukleofiili, happo/emäs-katalyytti ja sen pKa:ta nostava Asp muodostavat ns. katalyyttisen triadin (Machovic & Janecek 2003). Sen aminohapot on esitetty kuvassa 6 tikkumalleina.



**Kuva 6** *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylaasin (PDB ID: 1BAG, Fujimoto ym. 1998) rakenne kahdessa eri asennossa. A-domeeni on esitetty sinisen värisenä, B-domeeni vihreänä, ja alhaalla oleva C-domeeni harmaana. Substraatti (maltopentoosi) on esitetty tikkumallina jonka hiilet keltaisina ja hapet punaisina. Katalyyttiset aminohapot Asp176, Gln208, ja Asp269,  $\text{Ca}^{2+}$  sitova Asn101 ja sen viereinen substraattia sitova His102 on esitetty tikkumalleina, joissa hiilet saman väriset kuin kyseinen domeeni, hapet punaiset, ja tyypet siniset. Konservoitunut kalsium on esitetty vihreänä pallona, ja muut harmaana palloina. Ligandina käytetty molekyyli on esitetty pallotikkumallina (hiili harmaa, happi punainen, typpi sininen, vedyt jätetty pois). B-kuvassa on lisäksi esitetty pallotikkumalleina katalyyttiset aminohapot: nukleofiili Asp176, happo-emäskatalyytin paikalla oleva Gln208, sekä em. pKa:ta nostava ja substraattia sitova Asp269. Fujimoto ym. ovat mutatoineet Glu208 Gln208:ksi, jotta  $\alpha$ -amylaasi oli inaktiivinen ja voitiin kiteyttää substraatin kanssa.

$\alpha$ -amylaasit sitovat yhden tai useamman kalsiumin. Fujimoto ym. (1998) *B. subtilis*  $\alpha$ -amylaasin rakenteessa on kolme kalsiumionia, joista B-domeenissa sijaitseva on konservoitunut eri  $\alpha$ -amylaaseissa, ja heidän mukaan muut kaksi kalsiumionia ovat saattaneet sitoutua kiteytyksessä käytetyn suuren kalsiumpitoisuuden takia. Konservoitunut kalsium on esitetty kuvissa 6 ja 7 vihreänä pallona. *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus* ja alkalisessa *Bacillus*  $\alpha$ -amylaasissa B-domeeni sitoo yhden natriumin ja kaksi kalsiumia joista toinen vastaa eri  $\alpha$ -amylaaseissa konservoitunutta kalsiumia, ja A ja C domeenien väliin sitoutuu kolmas kalsium (Machius ym. 1998, Suvd ym. 2001, Shirai ym. 2007). Kuvassa 7 on

esitetty *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylaasin rakenne (Machius ym. 1998). Machius ym. (1998) mukaan  $\alpha$ -amylaasin B-domeeni on kooltaan ja rakenteeltaan vaihtelevin, mikä voidaankin havaita vertaamalla kuvissa 6 ja 7 vihreällä merkittyjä B-domeeneja. Kuvan 7 *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylaasin B-domeenissa on mm. kaksi pitkäkköä beta-levyä joita ei ole kuvan 6 *B. subtilis*  $\alpha$ -amylaasissa.



Kuva 7 *Bacillus licheniformis* amylaasin (PDB 1BLI, Machius ym. 1998) rakenne kahdesta kuvakulmasta. Domeenien A, B ja C väritys on sama kuin kuvassa 6. Katalyyttiset aminohapot Asp231, Glu261, Asp328,  $\text{Ca}^{2+}$  sitova Asn104, ja substr. sitova His105 on esitetty tikkumalleina kuten kuvassa 6. Kalsiumit on esitetty palloina, joista konservoitunut on kirkkaanvihreä ja kaksi muuta vaaleanvihreitä

Machius ym. (1998) mukaan kalsiumien sitomisen seurauksena B-domeeni laskostuu rakenteeksi, joka mahdollistaa substraatin sitomisen, ja siksi kalsium on tärkeä aktiivisuudelle. Brzozowski & Davies (1997) mukaan konservoitunut kalsium stabiloi B-domeenin konformaation *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylaasissa, ja siinäkin tämä vaikuttaa substraatin sitomiseen. Fujimoto ym. (1998) *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylaasin rakenteessa yhden  $\text{Ca}^{2+}$ ia sitovan aminohapon eli Asn101 viereinen His102, sitoo substraattia ja nukleofiilia Asp176, ja siten  $\text{Ca}^{2+}$  on yhteydessä substraattia sitovaan aminohappoon ja katalyyttiseen nukleofiiliin (ks. kuva 6, Asn101 ja His102 on esitetty tikkumalleina). Machius ym. (1998) mukaan  $\alpha$ -amylaasin aktivaatio kalsiumin sitomisen seurauksena mahdollistaa sen, että se aktivoituu vasta solun ulkopuolella jossa  $\text{Ca}^{2+}$  konsentraatio on suurempi, mikä voi olla syy tämän rakenteen säilymiseen evoluutiossa.

Stam ym. (2006) ovat jakaneet GH13 ryhmän entsyymit 35:een alaryhmään. GH13 proteiineissa esiintyy EC numeroltaan 26:ta eri aktiivisuutta (Stam ym. 2006). Stam ym. (2006) mukaan suurin osa alaryhmistä linkittyy tiettyyn aktiivisuuteen ja siten sekvenssi-perusteiset alaryhmät kuvaavat aktiivisuuksia.

### *Exiguobacterium*-sukuun kuuluu psykoofiilejä ja ne erittävät entsyymejä jotka voivat olla teollisesti kiinnostavia

$\alpha$ -amylaasi päätettiin puhdistaa *Exiguobacterium* sp. RB3 kannasta (Herranen ym. 2010), koska tämä kanta tuottaa verrattain hyvin folaattia (Kariluoto ym. 2010), se tuottaa  $\alpha$ -amylaasia ja proteaasia, mutta ei mitään  $\beta$ -glukanaasia (Herranen ym. 2010), ja koska se alentaa kaurakuidun viskositeettia (julkaisemattomat tulokset). Biokemiallisten ominaisuuksien avulla saadaan selville, onko  $\alpha$ -amylaasi ylipäättään aktiivinen kaurakuidun fermentaatioissa. Esim. pH-aktiivisuuskäyrän avulla selviää, onko se aktiivinen SOF-kaurakuitupreparaatin pH:ssa 6,5 (Kivelä ym 2009), ja katoaako aktiivisuus pH:n siit laskiessa fermentoinnin aikana. Lisäksi puhdistuksen aikana saatetaan saada fraktio, jossa on RB3 kannan erittämä proteaasi amylaasista puhtaana, jolloin saataisiin molemmat entsyymit yhdellä puhdistuksella.

Kasana & Pandey (2018) mukaan *Exiguobacterium* lajeista on löydetty proteaaseja, lipaaseja, sellulaaseja, amylaaseja, ksykanaaseja, pullulanaaseja, pektinaaseja ja mannanaaseja. Jotkin *Exiguobacterium* suvun lajit kasvavat emäksisessä ympäristössä. Muun muassa Collins ym. (1983) mukaan *E. aurantiacum* kanta kasvaa pH välillä 6,5 – 11,5. Tähän mennessä *Exiguobacterium*-lajeista on karakterisoitu kaksi  $\alpha$ -amylaasia (Chang ym. 2013, Enampour ym. 2015). Chang ym. (2013) karakterisoima *Exiguobacterium*-amylaasi on 70% aktiivinen pH:ssa 9, ja pH:ssa 8,5 ja 15 °C:ssa sen aktiivisuus on 32% maksimaalisesta (joka saavutetaan 40 °C:ssa). Enampour ym. (2015) mukaan *Exiguobacterium* sp. SH3  $\alpha$ -amylaasin aktiivisuus 0 °C:ssa on 41% maksimaalisesta (joka saavutetaan 30 °C:ssa), ja heidään mukaansa sen aktivaatioenergia on matalampi kuin *Pseudoalteromonas haloplanktis* psykofiilin  $\alpha$ -amylaasilla.

Em. perusteella RB3 kannan  $\alpha$ -amylaasi saattaisi olla tavallista aktiivisempi matalissa lämpötiloissa ja/tai korkeassa pH:ssa, koska ainakin Enampour ym. (2015) ja Chang ym. (2013) karakterisoinnit viittaavat siihen suuntaan, ja muutenkin suvussa esiintyy psykoofiilejä. Kylmässä lämpötilassa aktiiviset entsyymit ovat haluttuja pyykin- ja astianpesukoneaineisiin, koska pesut pyritään tekemään matalassa lämpötilassa energian säästämiseksi. Korkeassa pH:ssa aktiivisilla amylaaseilla on käyttöä em. lisäksi tärkkelyksellä vahvistetusta kierrätyspaperista valmistetun sellun keitossa, ja kierrätyspaperin painovärin poistossa, paperin vahvistamisessa mm. tärkkelyksellä, ja tekstiiliteollisuudessa langan kutomisen aikana käytetyn tärkkelyksen poistossa (patentti EP 1637596 B1).

*Exiguobacterium*-lajit ovat grampositiivisia (Collins ym. 1983), ja kuuluvat Bacillales-jaksoon kuten *Bacillus*-sukukin, ja edelleen firmikuutteihin (Vishnivetskaya ym. 2009, Kasana & Pandey 2018). Grampositiiviset bakteerit erittävät solunulkoiset entsyymit käyttäen tyyppin II eritysureittii. *Exiguobacterium*-suvun lajit ovat fakultatiivisesti anaerobisia (Vishnivetskaya ym. 2009, Collins ym. 1983). Kasana & Pandey (2018) mukaan niitä on eristetty hyvin monenlaisista ympäristöistä mikä kuvastaa niiden kykyä sopeutua. Vishnivetskaya ym. (2009) mukaan *Exiguobacterium* suvun lajit jakaantuvat kahteen ryhmään, joista toisessa on psykoofiilisia ja toisessa lievästi termofiilisia kantoja. Kaksi Siperian ikiroudasta eristettyä kanta kykenee kasvamaan -2,5...+40 C lämpötiloissa (Rodrigues ym. 2006), ja yksi jopa -6 C lämpötilassa (Vishnivetskaya ym. 2009). Ennalta tiedettiin, että RB3 kantamme 16SrDNA sekvenssi on lähempänä psykoofiilista ryhmää kuin lievästi termofiilista ryhmää.

Ainakin *E. sibiricum* (Rodrigues ym. 2006), ja *E. aurantiacum* (Collins ym. 1983) lajien määrittelyihin kuuluu *Bacilluksista* poiketen, etteivät ne itiöi. Siten ne voisi tarvittaessa tappaa elintarvikkeesta kuumentamalla. *E. aurantiacum* fermentoi sekahappokäymisellä etikka-, maito- ja muurahaishappoa (Collins ym. 1983). Elintarvikesovelluksessa nämä edistäisivät elintarvikkeen säilymistä.

## Työn tavoitteet ja suorituspaikka

Tämän työn tavoitteina oli:

- a. puhdistaa *Bacillus sp.* ABM5119:n endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi, ja *Exiguobacterium sp.* RB3:n  $\alpha$ -amylaasi ainakin siinä määrin, että ne ovat muista endo-aktiivisista glykosyylhydrolaaseista ja proteaaseista puhtaita. Jos amylaasin puhdistuksen yhteydessä saadaan fraktio, jossa on proteaasi puhtaana amylaasista, niin se otetaan talteen
- b. mitata yhdessä ja erikseen endo- $\beta$ -1,4-glukanaasin,  $\alpha$ -amylaasin ja proteaasin vaikutus keitetyn kaurakuidun viskositeettiin
- c. mitata puhdistetun *Exiguobacterium sp.* RB3 amylaasin olennaisimmat biokemialliset ominaisuudet, sekvensoida sen geenin amylaasia koodaava alue, ja selittää sen ominaisuuksia sekvenssistä saatavan informaation perusteella, sekä verrata ominaisuuksia muihin amylaaseihin

Tämä työ tehtiin Helsingin yliopiston yleisen mikrobiologian osastolla. Viskositettimittaukset tehtiin viljateknologian ryhmän laboratoriossa.

## Materiaalit ja Menetelmät

### Kaurakuitu ja kasvatusalustat

Kaurakuitu OatWell 14 % (SOF) on hankittu Swedish Oatfibrelta (Ruotsi). Sen koostumus on kuvattu taulukossa 1. Keittäminen on kuvattu metodissa ”Entsyymien vaikutus kaurakuituvellin viskositeettiin”.

YP alustassa oli 10 g/L hiivauutetta (Biokar, Ranska), ja 20 g/L tryptonia (Biokar), jotka oli liuotettu MQ-veteen ja autoklavoitu. YPD alustassa on lisäksi 20 g/L glukoosia. YP- ja YPD-maljoissa on em. lisäksi 20 g/L agarua (Merck). RB3 kantaa ylläpidettiin YP-maljoilla, ja ABM5119 kantaa YPD-maljoilla. Entsyymien tuottokasvatuksissa liemeen lisättiin 2 mM CaCl<sub>2</sub> ja *Bacillus sp.* ABM5119:lä myös Avicel PH-101 selluloosaa (Merck).

### Mikrobit

*Exiguobacterium sp.* RB3, ja *Bacillus sp.* ABM5119 -kannat on eristetty ja identifioitu kuten on aiemmin kuvattu (Herranen ym. 2010).

### Kaupalliset entsyymipreparaatit

Aquazym 800 MG ja Denimax BT oli hankittu Novo Nordisk A/S:lta (nyk. Novozymes, Bagsvaerd, Tanska). Denimaxia käytetään farmarikankaan kivipesun korvaavassa entsyymaattisessa pesussa (Novozymesin internet sivusto, Denim Abrasion).  $\beta$ -1,4-endoglukanaasiaktiivisuutta on preparaatissa ollut alun perin 140 IU/g. Aquazym on amylaasivalmiste



(Novozymesin internet sivusto, Forest, Starch modification). Lysing enzyme (Sigma) on *Trichoderma harzianum* –homeen solunulkoisista entsyymeistä tehty preparaatti, joka valmistajan mukaan sisältää kitinaasi-, sellulaasi-, ja proteaasiaktiivisuuksia. Proteaasi K oli hankittu Sigmalta.

## Entsyymiaktiivisuuksien ja proteiinipitoisuuden määritykset

$\alpha$ -amylaasi-, endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi-, ksylanaasi-, ja proteaasiaktiivisuudet määritettiin Red Starch, Azo-CMC, Azo-Wheat Arabinoxylan, ja Azo-Casein atsoväjättyihin saostuviin substraatteihin perustuvilla määritysmenetelmillä (Megazyme, Wicklow, Irlanti). Jotta määritykset voitiin tehdä käyttäen 96-kuoppalevyspektrofotometriä (Multiskan, valmistaja: Labsystems tai Thermo), reaktiotilavuutta pienennettiin siten, että reaktion pysäytyksen ja saostuksen jälkeinen tilavuus oli 200  $\mu$ l säilyttäen kuitenkin valmistajan määräämät reagenssien tilavuuksien suhteet (joka johtaa eri kokoiisiin reaktiotilavuuksiin aktiivisuudesta riippuen, ks. myöh.). Selvyden vuoksi määritysmenetelmät kuvataan seuraavassa kokonaan. Entsyymipreparaattia laimennettiin entsyymimäärityspuskurilla vähintään puoleen.  $\alpha$ -amylaasi- ja proteaasimääritysten puskuri oli 50 mM BisTris propane – HCl – 50 mM NaCl – 1 mM CaCl<sub>2</sub> – 0,05 % BSA pH 7,0 (reaktion konsentraatiot), paitsi RB3 kannan  $\alpha$ -amylaasin pH-aktiivisuuskäyrän mittauksessa käytettiin seuraavia puskureita: pH 4,0, 4,5, 5,0, ja 5,5 50 mM asetaatti – 50 mM NaCl – 1 mM CaCl<sub>2</sub> – 0,05 % BSA, pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 ja 9,0 50 mM BisTris propane – HCl – 50 mM NaCl – 1 mM CaCl<sub>2</sub> – 0,05 % BSA, sekä pH 10 ja 11 50 mM CAPS – NaOH – 50 mM NaCl – 1 mM CaCl<sub>2</sub> – 0,05 % BSA. Endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi- ja ksylanaasimääritykset tehtiin 50 mM asetaatti – 50 mM NaCl – 1 mM CaCl<sub>2</sub> pH 4,5 –puskurissa (reaktion kons.).  $\alpha$ -amylaasireaktion aloituksessa laimennettuun (vesihauteessa esilämmitettyyn) entsyymipreparaattiin lisättiin puolet sen tilavuudesta (eli 25  $\mu$ l) 2 % (w/v) Red Starch liuosta (valmistajan antama tilavuussuhde). Muissa lisättiin yksi entsyymipreparaatin tilavuus 2 % (w/v) Azo-CMC, 1 % (w/v) Azo-Wheat Arabinoxylan, tai 2 % (w/v) Azo-Casein substraattia, ja sekoitettiin purskuttelemalla pipetillä (eli esim. 25  $\mu$ l laim. ents. ja 25  $\mu$ l 2 % Azo-Casein). Reaktiotilavuudet olivat:  $\alpha$ -amylaasi 75  $\mu$ l, endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi 60  $\mu$ l, proteaasi 50  $\mu$ l ja ksylanaasi 60  $\mu$ l. Kaikissa määrityksissä reaktiota inkuboitii Eppendorf putkessaan 10 min 40 °C vesihauteessa. Reaktion inkuboinnin jälkeen se pysäytettiin ja reagoimaton substraatti saostettiin lisäämällä kyseisen substraatin saostusreagenssia 200  $\mu$ l asti. Substraattien saostusreagenssit olivat: Red Starch ja Azo Wheat Arabinoxylan: 95% (v/v) etanoli, Azo-Casein: 5 % (w/v) trikloorietikkahappo, ja Azo-CMC: 76% (v/v) etanoli – 20 mM sinkkiasetaatti. Reaktiot saostettiin pitämällä jäällä 5-10 min. Sentrifugoitiin 2 min, 16000 g (Heraeus Biofuge). 96-kuoppalevylle pipetoitiin supernatanttia 170  $\mu$ l. Blankit tehtiin siten, että saostus- ja pysäytysreagenssi pipetoitiin ennen substraatin lisäämistä. Red Starch  $\alpha$ -amylaasimäärityksissä absorbanssi mitattiin 492 nm aallonpituudella valmistajan ohjeen 510 nm:sta poiketen. Endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi- ja ksylanaasiaktiivisuuksien absorbanssit mitattiin käyttäen 595 nm aallonpituutta, ja proteaasin 450 nm kuten valmistajan alkuperäisessä ohjeessa. 96-kuoppalevyspektrofotometrin käytön takia valotie lyheni 1 cm:stä 4 mm:iin ja tämä otettiin kaikissa määrityksissä huomioon korjauskertoimella 1,0 cm / 0,4 cm = 2,5.  $\alpha$ -amylaasimäärityksissä käytetyn aallonpituuden takia niissä absorbanssi korjattiin vielä kertoimella 1,435 vastaamaan 510 nm aallonpituuden absorbanssia. Laskettaessa aktiivisuutta (mU/ml) käytetään alun perin standardikäyristä johdettuja kertoimia jotka valmistaja (Megazyme) on antanut. Kertoimet olivat:  $\alpha$ -amylaasi: 203, endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi: 833,2, proteaasi: 129, ja ksylanaasi: 386,6. Edellä mainittuihin perustuen aktiivisuudet laskettiin seuraavasti:

$\alpha$ -amylaasi: aktiivisuus (mCU/ml) = (reaktion abs. – blank abs.) \* 2,5 \* 1,435 \* 203 \* laimennos

endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi: aktiivisuus (mU/ml) = (reaktion abs. – blank abs.) \* 2,5 \* 1,435 \* 833,2 \* laimennos

proteaasi: aktiivisuus (mU/ml) = (reaktion abs. – blank abs.) \* 2,5 \* 1,435 \* 129 \* laimennos

ksylanaasi aktiivisuus (mU/ml) = (reaktion abs. – blank abs.) \* 2,5 \* 1,435 \* 386,6 \* laimennos

Yksi yksikkö (U) tarkoittaa yksi mikromooli hydrolysoituja glykosidisidoksia minuutissa. Aktiivisuudet ja niiden otoskeskihajonnat laskettiin Microsoft Excelillä.

Proteiinipitoisuuden määrittäykset tehtiin Bradford (1976) mukaan, käyttäen naudan seerumialbumiinia (BSA)(Sigma) standardina.

## Kaupallisen pesuaineen käsittely amylaasin detergenttistabiilisuuskoea varten

Liuotettiin 20 g/L pesuainetta Milli-Q veteen. Keitettiin tunti. Säilytettiin 4 °C lämpötilassa.

## SDS-PAGE ja tsymografiat

SDS-PAGE tehtiin Laemmli (1970) mukaan käyttäen Miniprotean II ja 3 elektroforeesilaitteita (Biorad). Molekyylipainostandardina käytettiin PageRuler Prestained:ia (Fermentas). Tsymogrammigeelit tehtiin muuten kuten SDS-PAGE geelit, mutta lisäksi niihin valettiin 0,2% (w/v) karboksimeetyliselluloosaa (CMC, Na-suola, Fluka), 0,25% (w/v) kauran ksylaania (Sigma), tai 0,5% Red Starch tärkkelystä (Megazyme). Ajon jälkeen geelit huuhdeltiin vähintään kerran Milli-Q -vedellä. Renaturoitiin entsyymit inkuboimalla geelejä 15 min 1 % Triton X-100:ssa 37 °C:ssa heiluttelijassa (Stovall Belly Dancer, 15 RPM). Tämän jälkeen CMC-, ja ksylaanigeelit upotettiin 0,1 M asetaatti – 0,1M NaCl – 2 mM CaCl<sub>2</sub> pH 4,5 puskuriin, ja tärkkelysgeelit 0,1 M BisTris propaani – HCl – 0,1M NaCl – 2 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7,0 puskuriin. Inkuboitiin staattisesti 37 °C:ssa vähintään 30 min. Ksylaani-, ja CMC-geelit, tai niiden tsymografiapuolet, värjättiin 0,2% (w/v) kongopunalla (Sigma, dye content ~54%) heiluttelemalla 1 h 37 °C:ssa (Stovall Belly Dancer, 15 RPM). Geeli huuhdeltiin ainakin kaksi kertaa MQ:lla <1 min huuhteluun, ja sitten inkuboitiin 5 min heiluttelijassa 1 M NaCl:ssa huoneenlämmössä, jonka jälkeen geeli kuvattiin. Kun geeli värjättiin Coomassilla Blue:lla, niin sitä inkuboitiin värjäysliuoksessa (0,05% Coomassie Blue R - 5% (v/v) MetOH – 7% etikka) 37 °C:ssa heiluttellen vähintään tunti, ja sitten inkuboitiin geeliä värinpoistoliuoksessa (5% (v/v) MetOH – 7% etikka) 37 °C:ssa heiluttellen vähintään tunti, kuten normaaleja SDS-PAGE geelejä. Geelejä jotka oli värjätty sekä kongopunalla, että Coomassie Blue:lla inkuboitiin värjäysten jälkeen hetki 0,1M Tris-HCl pH 8,8:ssa, jotta geelin pH nousi, jotta kongopunan väri palautui violetinmustasta punaiseksi, jotta proteiinijuovat erottuivat taustasta.

## Entsyymien tuottokasvatukset mikrobeilla

Kasvatukset tehtiin 300 ml Klett-pulloissa ravistelijassa (malli CH-4103, Infors AG, Bottmingen). RB3 kannan esikasvatusta siirrostettiin 10\*0,5 ml 10\*50 ml:aan YP - 2 mM CaCl<sub>2</sub> -lientä 300 ml Klett-pulloihin, ja ravisteltiin 180 RPM 28 °C 17 h ajan. ABM 5119 kannan esikasvatusta siirrostettiin 2\*0,5 ml 2\*50 ml:aan YP - 1% Avicel – 2 mM CaCl<sub>2</sub> -lientä 300 ml Klett-pulloihin ja ravisteltiin 180 RPM 28 °C 48 h ajan. Kasvatukset sentrifugoitiin 5100 g 10 min 4 °C, kaadettiin supernatantti talteen, ja otettiin niistä yhden millilitran näytteet.

## Kasvatusten supernatanttien, ja muiden proteiinipreparaattien konsentroinnit ja pesut

Suoritettiin Amicon Ultra-15 10000 MWCO Regenerated cellulose ultrasuodatusmembraaneilla (Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Carrigtwohill, Cork, Irlanti). Kasvatusten supernatantti ensin konsentroidiin Amiconeihin, ja sitten se pestiin niissä neljästi nelinkertaisella tilavuudella 20 mM Tris - HCl – 1 mM CaCl<sub>2</sub> pH 8,0 puskuria. Sentrifugoinnit 5100 g 15 min 8 °C. Ammoniumsulfaattifraktiot konsentroidiin, ja pestiin samalla tavalla kuten supernatantti mutta pestiin vain kerran, ja 4 °C:ssa. Käytön jälkeen Amiconit säilytettiin 20 % EtOH:ssa 4 °C seuraavaan käyttöön asti.

Puhdistuskokeilu 50 kDa MWCO ultrasuodatusmembraanilla tehtiin siten, että käytettiin Ultracel YM-50 (Millipore) membraania sen ohjeen mukaan sillä lisäyksellä, että rententaatin ulos sentrifugoinnin jälkeen membraani vielä huuhdeltiin puskurilla (20 mM Tris – HCl – 1 mM CaCl<sub>2</sub> pH 8,0), ja se sentrifugoitiin talteen Eppendorf-putkeen membraaniyksikkö nurin päin kaikkien retentoituneitten proteiinien keräämiseksi.

## DEAE-Trisacryl anioninvaihtokromatografiat

DEAE-Trisacryl Plus M (Sigma) anioininvaihtajasta pakattiin halkaisijaltaan 1,5 cm, ja pituudeltaan 3,5 cm pylväs lasiseen 1,5 cm x 15 cm kokoiseen kromatografiapylvääseen (BioRad). Kromatografia suoritettiin sekä RB3, että ABM5119 kannan puhdistuksessa huoneenlämmössä (~22 °C) FPLC laitteistolla (Pharmacia LCC-500 Plus, 2 kpl P-100, MV-7). Kromatografiassa käytettiin 20 mM Tris - HCl – 1 mM CaCl<sub>2</sub> pH 8,0 ja 20 mM Tris - HCl – 1 mM CaCl<sub>2</sub> - 1 M NaCl pH 8,0 puskureita, joita laitteistolla sekoitettiin NaCl-gradientin aikaansaamiseksi. Pylväs tasapainotettiin ensin mainitulla puskurilla.

Näyte, eli konsentroidu supernatantti, syötettiin anioininvaihtajaan. Käynnistettiin seuraava eluointiohjelma: Eluointiin pylvästä 24 ml:lla eli noin neljällä pylvään tilavuudella 0 M NaCl puskuria. Eluointiin 50 ml (~8 pylvään tilavuutta) pitkä lineaarinen NaCl-gradientti 0 M NaCl:sta 0,5 M NaCl:iin. 24 ml 1 M NaCl puskurilla, ja lopuksi 26 ml 0 M NaCl puskurilla. Eluointinopeus oli 2 ml/min. Eluoinnin aikana kerättiin 1,5 ml fraktioita jälle, kunnes alkoi viimeinen 0 M NaCl puskurilla eluointi.

## HiTrap sulfopropyyli kationinvaihtokromatografia

Käytettiin samoja puskureita ja samaa FPLC-laitteistoa kuin DEAE-kromatografiassa, mutta tehtiin 4 °C lämpötilassa. Käytettiin valmiiksi pakattua HiTrap 5 ml SP Sepharose (Pharmacia) kromatografiapylvästä. Pylväs tasapainotettiin 0 M NaCl puskurilla. Näyte syötettiin siihen, ja sen aikana kerättiin 1,5 ml fraktiot 1 ja 2. Aloitettiin eluointiohjelma: Ensin 25 ml 0 M NaCl puskurilla, 50 ml pitkä lineaarinen NaCl-konsentraatiogradientti 0 M – 0,5 M NaCl, 5 ml 1 M NaCl puskurilla, ja lopuksi 5 ml 0 M NaCl puskurilla. Eluointinopeus oli 5 ml/min. Kerättiin 1,5 ml fraktioita jälle, kunnes alkoi viimeinen 0 M NaCl puskurilla eluointi.

## Ammoniumsulfaattisaostus

Pilottikokeet saostusvälien selvittämiseksi tehtiin siten, että kylmää saturoitua ammoniumsulfaattiliuosta lisätin preparaattiin sen verran, että saavutettiin suoraan haluttu saturaatio-%. Tällöin siis esim. 70 saturaatio-% fraktio tarkoittaa 0-70 saturaatio-% fraktiota, ei esim. 60-70 saturaatio-% fraktiota. Inkuboitiin jäällä 30 min, ja sentrifugoitiin 14500 g 15 min 4 °C. Varsinaisessa saostuksessa saostettiin jäällä lisäämällä kylmää saturoitua ammoniumsulfaattiliuosta,

ja inkuboimalla noin tunti. Sentrifugoinnit 14500 g 15 min 4 °C. Sakat liuotettiin DEAE-yhd. fraktion alkuperäiseen tilavuuteen 20 mM Tris-HCl – 1 mM CaCl<sub>2</sub> pH 8,0 puskuria jäällä.

Liuotetut fraktiot konsentroitiin ja pestiin kerran ultrasuodattamalla (ks. Kasvatusten supernatanttien ja muiden proteiinipreparaattien konsentroinnit ja pesut). Pesussa käytettiin 20 mM Tris-HCl – 1 mM CaCl<sub>2</sub> pH 8,0 puskuria.

## Entsyymien vaikutus kaurakuituvellin viskositeettiin

SOF:sta tehtiin 3,5 % (w/v) suspensio kuumaan MQ-veteen (250 ml). Kuumennettiin kaasuliekillä kiehuvaksi lasisessa dekanterissa lasisauvalla sekoittaen, ja keitettiin 10 min sekoittaen. Pipetoitiin vettä 1,2 ml eppareihin (käyttäen katkaistuja kärkiä) ja vellin jäähtyttyä lisättiin entsyymipreparaatit (< 50 µl). Inkuboitiin koeputkisekoittajassa (Snijders) 28 °C lämpötilassa. Sentrifugoitiin 16000 g 1 min. Pipetoitiin 0,4 ml supernatanttia viskosimetrin (Haake) levyille (35 mm halk., 2° kulma -levy). Mitattiin viskositeetti 20 °C lämpötilassa. Viskosimetrin ohjelmassa ensin näytettä sekoitettiin 10 s ajan leikkausnopeudella 0,3 1/s, ja sitten tehtiin leikkausnopeusgradientti väliltä 10 1/s – 100 1/s mitaten dynaaminen viskositeetti 10 1/s välein. Data käsiteltiin Microsoft Excelissä. Eri käsittelyiden viskositeetti prosenttiosuutena kontrollin viskositeetista laskettiin suhteessa kontrollien keskiarvon viskositeettiin. Käsittelyjen tulosten keskihajonnat ovat otostakeskihajontoja. P-arvot laskettiin kaksisuuntaisella t-testillä olettaen erisuuret varianssit koska datan perusteella varianssit erosivat eri tapauksissa.

## Kromosomaalisen DNA:n eristys bakteereista

RB3 ja ABM5119 kannat siirrostettiin maljoilta 25 ml:aan YP-, ja YPD-liemiä. Kasvatettiin 300 ml klett pulloissa 21 h 28 °C 180 RPM ravistelijassa (Infors). Otettiin 1,5 ml näytteet ja ne sentrifugoitiin 6000 g 2 min. Poistettiin supernatantti. Resuspensoitiin TE puskuriin (50 mM Tris-HCl – 20 mM EDTA pH 8,0). Lisättiin lysosyymia (Roche) 0,05 mg (1000 Shugar yksikköä). Inkuboitiin 20 min 42 °C. Lisättiin SDS:ää siten, että konsentraatioksi tuli 1%, ja proteinaasi K:ta siten, että sitä tuli 0,2 mg. Inkuboitiin 2 h 37 °C. DNA eristettiin fenoliuuttamalla Sambrook & Russell (2001) mukaan.

## *Exiguobacterium* RB3 amylaasin geenin alukkeiden suunnittelu ja PCR

Chang ym. (2013) karakterisoiman *Exiguobacterium* sp. DAU5 amylaasin sekvenssistä (ncbi accession number JQ706070) tiedettiin varmuudella, että se on *Exiguobacterium* suvun amylaasi. Haettiin sen avulla proteiini-BLAST:lla (Altschul ym. 1990) *Exiguobacterium*-amylaasien proteiinisekvenssejä. Niiden ja neljän *Bacillus* amylaasin, sekä *Aspergillus oryzae* homeen amylaasin proteiinisekvensseistä tehtiin linjaus MAFFT:lla (Katoh & Standley 2013), joka on esitetty liitteessä yksi. *E. sibiricum* amylaasin aminohapposekvenssi (accession number WP\_026828843) oli N-, ja C-terminaalisista päistään homologinen *E. antarcticum*, *E. acetylicum*, *E. undae*, ja *E. oxidotolerans*, sekä melko homologinen kahden *Bacillus* amylaasin kanssa. RB3 kanta on läheistä sukua *E. sibiricumille*, joten oli syytä epäillä RB3 kantamme amylaasin sekvenssin olevan N- ja C-päistä sama kuin *E. sibiricum* amylaasissa, ja siksi valittiin se alukkeiden suunnittelun pohjaksi.

Forward-alukkeessa otettiin huomioon, se että grampositiivisen bakteerin N-terminaalinen erityssignaali haluttiin jättää pois. Amylaasin GenBank tietueessa (WP\_026828843) ilmoitetaan erityssignaalin päättyvän 31. aminohappoon. Siksi otettiin sekvenssiksi se mitä alkaa aminohaposta 32. Aluke lopetettiin sekvenssissä esiintyvään tryptofaaniin (W) koska sillä on vain yksi kodoni (tgg), jolloin alukkeen 3'-päähän saadaan varma pariutumisen, mikä parantaa PCR:n onnistumistodennäköisyyttä.

Siten aminohapposekvenssi, jonka perusteella forward aluke suunniteltiin on: NGTMMQYFEW

C-terminaalisen pään aminohapposekvenssi reverse aluketta varten on: GGSVSIYTQQ

Osittain degeneroidut alukesekvenssit luotiin takaisin transloimalla ne aminohapposekvenssistä ja lyhentämällä sen mittaisiksi, että PCR:n annealing lämpötilat olivat riittävän lähellä toisiaan. Tarkistettiin NEBcutter-ohjelmalla (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/> , New England Biolabs) etteivät *E. sibiricum* eikä *Exiguobacterium sp.* DAU5 amylaasin nukleotidisekvenssit sisällä *EcoRI*-rekstriktioentsyymin katkaisukohtia (gaattc), ja lisättiin ne sekä restriktioentsyymin vaatimat ylimääräiset nukleotidit alukkeisiin. Alukkeiden nukleotidisekvenssit olivat (*EcoRI* kohdat alleviivattu):

AmyFw-aluke: aaa gaa ttc aaa cgg tac gat gat gca rta ytt yga rtg g

AmyRev-aluke: aaa gaa ttc tta ctg ctg gcg rta tac gga aac nga ncc ncc

Amylaasigeenin PCR reaktioissa oli:

1 U	Phusion Flash polymeraasia 2x master mix -puskurissa
50 pmol	AmyFw-aluketta
50 pmol	AmyRev-aluketta
238 ng	kromosomaalista DNA:ta

Reaktiot tehtiin 50 µl tilavuudessa.

Koska ei voitu kuitenkaan olla varmoja onko RB3 amylaasigeenin sekvenssissä alukkeiden kohdalla eroja *E. sibiricum*in sekvenssiin, tehtiin reaktio neljässä eri annealing lämpötilassa: 72 °C, 67,5 °C, 58,2 °C ja 50 °C. PCR laite oli BioRad T100. PCR-ohjelma oli seuraava:

alkudenaturaatio	98 °C, 30 s
34 kertaa:	
denaturaatio	98 °C, 20 s
annealing	72 °C, 67,5 °C, 58,2 °C ja 50 °C, 30 s
ekstensio	72 °C, 48 s
em. jälkeen:	
loppuekstensio	72 °C, 5 min
säilytys	4 °C

## Sekvensoitavan plasmidin konstruktio

PCR tuotteet ajettiin 0,75 % agarosigeelissä TAE-puskurissa 7 V/cm sähkökentän voimakkuudella 70 min, värjättiin geeliä tunti etidiumbromidiliuoksella, ja tarkasteltiin UV-valossa. Tuloksen perusteella 58,2 °C annealing lämmön reaktio puhdistettiin Qiaquick Spin kolumnilla (Qiagen) valmistajan ohjeen mukaan. Näin saatu insertti ja pUC19 vektori

digestoitii *EcoRI* restriktioentsyymillä (10 U, Fermentas) BSA:llisessa puskurissaan (puskuri ”O”, Fermentas) yli yön 37 °C lämpötilassa. Digestoidut insertti ja vektori puhdistettiin Qiaquick Purification MinElute -pylväillä (Qiagen) valmistajan ohjeen mukaan. Ne ligoitiin T4 ligaasilla (5 Weiss-yksiköä, Thermo) 9/1 -moolisuhteessa (insertti/vektori) yön yli huoneenlämmössä (22 °C). Tämä transformoitiin *E. coli*n  $\text{CaCl}_2$ -mentelmällä. Transformantit seulottiin sinivalkokloonauksella, ja positiivisista tehtiin puhtasvilmät. Näistä yhdestä eristettiin plasmidi-DNA (Qiagen), ja se lähetettiin sekvensoitavaksi.

### *Exiguobacterium* sp. RB3 amylaasigeenin sekvensointi

Tehtiin ostopalveluna Helsingin yliopiston Biotekniikan instituutissa käyttäen BigDye terminator -kemialla. Ensin käytettiin pUC19 vektoriin pariutuvia alukkeita:

UP: cga cgt tgt aaa acg acg gcc agt

RP: ttt cac aca gga aac agc tat gac

Niillä saatujen sekvenssien perusteella suunniteltiin alukkeet:

amy7ap: acc cat caa gac caa gtt

amy7lp: agt tcc gcg gta ctg gta aag

joilla sekvensointia jatkettiin, jolloin saatiin sekvenssille kaksinkertainen peitto.

Yksittäiset sekvenssireadit yhdistettiin linjaamalla MAFFT:lla (Katoh & Standley 2013) ja käsin, ja näin saatiin amylaasiproteiinia koodaava nukleotidisekvenssi. Siitä poistettiin *EcoRI*-leikkauskohdat, mutta forward ja reverse alukkeiden kohdalla olleet sekvenssit jätettiin sekvenssiin ja merkittiin siihen pienellä, muun sekvenssin ollessa isolla kirjoitettua (Liite 2). Nukleotidisekvenssi transloitiin aminohapposekvenssiksi amylaasienproteiinien sekvenssien analysointia varten.

### Aminohapposekvenssien haku ja linjaus

RB3, DAU5, ja SH3 amylaasien kaltaisia aminohapposekvenssejä etsittiin tblastn:llä ja blastp:llä (Altschul ym. 1990). Tuloksina saaduista valittiin linjausta varten samankaltaisimmista lähinnä ne joilla oli myös lajinimi, ja jotka olivat samankaltaisimpia suhteessa siihen sekvenssiin jolla oli haettu. Lisäksi linjaukseen valittiin sellaisia *Bacillus* amylaaseja joiden biokemialliset ominaisuudet tunnetaan, ja joiden rakenne on määritetty röntgensädekristallografialla ml. RB3 amylaasin mallinnuksessa templaattina käytetty amylaasi (PDB id 1HVX), sekä amylaaseja joiden Stam ym. (2006) mukainen GH13 alaryhmä tunnetaan (otettu Sarian ym. 2017 artikkelista), sekä kaksi eri GH ryhmien, eli GH57 ja GH70 entsyymiä, joilla on samantapainen substraattispesifisyys ja samankaltainen rakenne (GH57: ( $\beta/\alpha$ )7-tyynyri, GH70 ( $\beta/\alpha$ )8-tyynyri, kuten GH13 A-domeenissa)(Cazy.org sivusto GH57, Cazy.org sivusto GH70) . Sekvenssien tunnistet on esitetty linjauksen nimissä, ja ne yksilöivät mitä sekvenssejä on käytetty.

Linjaus tehtiin MAFFT:lla (Katoh & Standley 2013) käyttäen oletusparametrejä koska ne arviottiin sopivaksi kompromissiksi tässä tapauksessa: matriisi BLOSUM62, aukon avaussakko 1,53 ja aukon jatkamissakko 0,123. Linjatut

sekvenssit on visualisoitu ClustalX 2.1 ohjelmalla (Larkin ym. 2007) (siis selvyuden vuoksi: Clustalin linjausalgoritmia ei ole käytetty linjaamiseen, vaan se on tehty MAFFT:lla). Visualisoituun linjaukseen tehtiin merkintöjä PaintShop Pro:ssa.

### *Exiguobacterium* sp. RB3 amylaasin rakenteen laskennallinen mallinnus

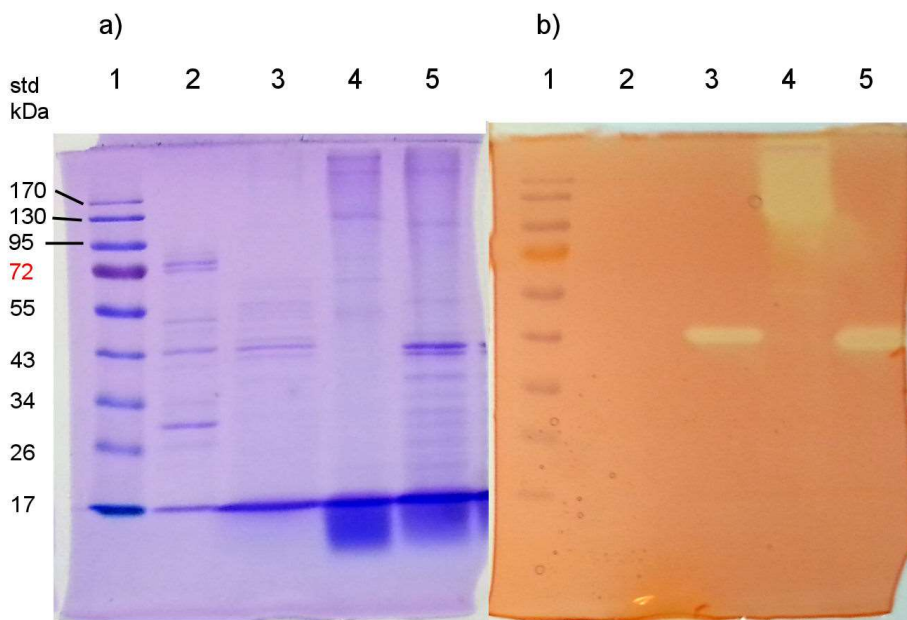
RB3 amylaasin rakenne homologiamallinnettiin käyttäen Robetta serveriä (<http://robetta.bakerlab.org/>), joka perustuu Rosetta -mallinnusalgoritmiin (Song ym. 2013). Mallin templaatiksi valikoitui proteiini jonka PDB id oli 1HVX, joka on *Bacillus stearothermophilus* alfa-amylaasi. Mallinnettiin samalla tavalla myös *Exiguobacterium* sp. DAU5 ja SH3 amylaasit, joiden templaateiksi tuli 1HVX ja 2AAA.

Rakenteet kohdistettiin päällekkäin (align), visualisoitiin, tarkasteltiin ja tietyt atomien väliset erot mitattiin PyMolissa (v 1.7.4.5 Edu, Schrödinger LLC). Myös johdannon rakennekuvat on visualisoitu PyMolilla, paitsi  $\beta$ -glukaanimolekyylit rakennettiin ja visualisoitiin Avogadrolla (v 1.2.0, [www.avogadro.cc](http://www.avogadro.cc)).

## Tulokset

*Bacillus* sp. ABM5119 kannasta saatiin puhdistettua endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi kahdella puhdistusvaiheella

Puhdistuksen suunnittelun kannalta oli hyödyllistä tietää jo alussa *Bacillus* sp. ABM5119 endo- $\beta$ -1,4-glukanaasin molekyyliaino. Siksi kasvatuksen jälkeen tehtiin tsmogrammi käyttäen substraattina karboksimeetyyliselluloosaa (CMC), joka on tälle aktiivisuudelle spesifinen substraatti. Kuvassa 8 b, jossa tsmogrammigeeli on värjätty kongopunalla, nähdään kaistoilla 3 ja 5 vaaleampi hydrolyysijuova noin 42-44 kDa kohdalla.



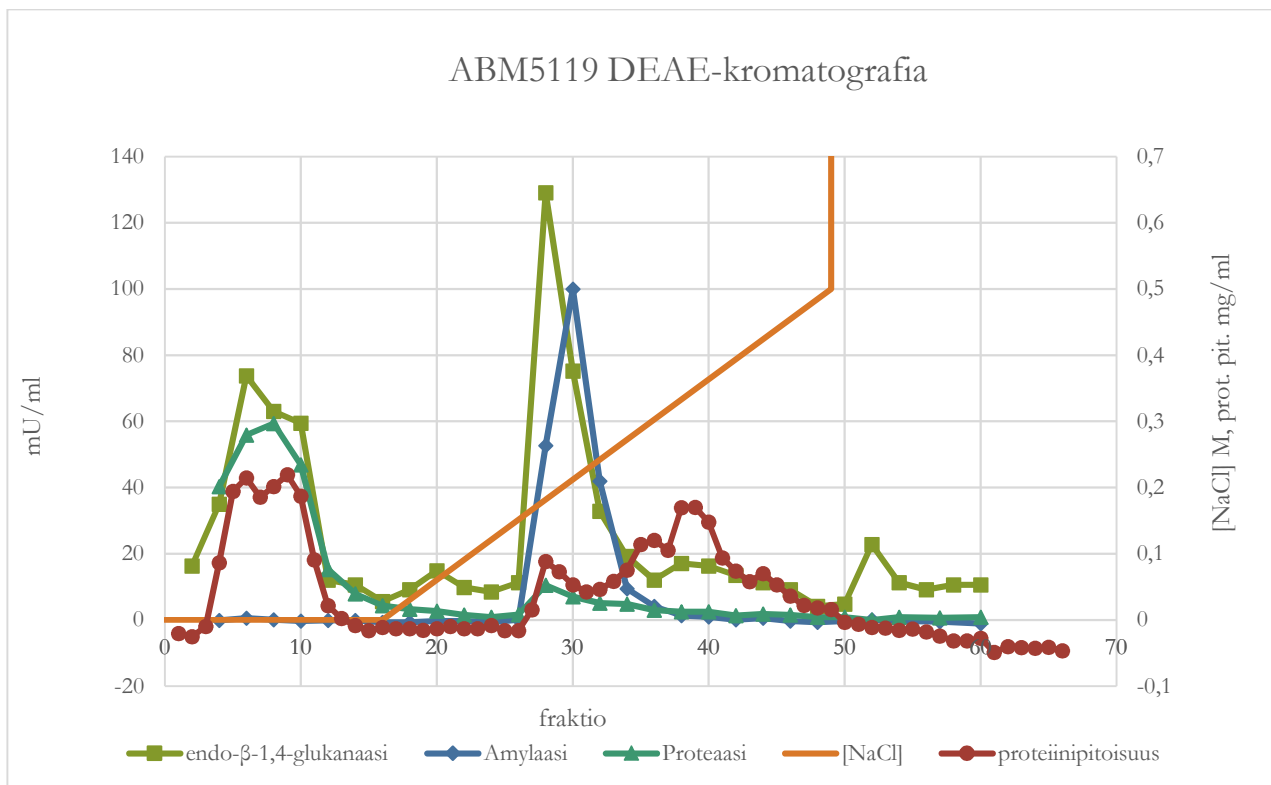
Kuva 8 ABM5119 supernatanttien SDS-PAGE-CMC-tsymogrammigeeli. a) Coomassie Blue:lla värjätty puolisko, b) kongopunalla värjätty puolisko. Kaistat: 1 PageRuler standardi, 2 lysing enzyme (b puolella tyhjä), 3 kasvatuksen supernatantti, 4 konsentroituu kasv. sup. 60 °C denaturoitu, 5 konsentroituu kasv. sup. 95 °C denaturoitu. a-geelin viereen on merkitty PageRulerin Prestained standardien molekyyliainot

Kuvassa 8 a on vastaava geeli, mutta Coomassie Blue:lla värjättyinä jolloin preparaatin proteiinit näkyvät. Kuvassa 8 a nähdään kaistoilla 3 ja 5 kaksi sinistä noin 42-44 kDa proteiinijuovaa.

Kasvatuksen supernatantti sentrifugoitiin bakteerien poistamiseksi, ja saatu supernatantti konsentroidiin ultrasuodatusmembraaneilla ja pestiin DEAE-kromatografian puskurilla. Kuten taulukosta 2 nähdään,  $\beta$ -1,4-endoglukanaasin puhdistuskerroin nousi pesussa 2,6:een. Konsentroidin jälkeen kokeiltiin pienellä määrällä molekyyllipainoon perustuvaa fraktiointia käyttäen 50 kDa pidätysrajan ultrasuodatusmembraania. Sillä ei kuitenkaan saavutettu merkittävää puhdistumista, koska lähes kaikki proteiinit jäivät retentaattiin, joten sitä ei käytetty.

### DEAE-Trisacryl anioninvaihtokromatografia

Konsentroidulle supernatantille tehtiin anioninvaihtokromatografia, jonka fraktioiden aktiivisuudet ja proteiinipitoisuudet nähdään kuvassa 9. Kuvan 9 käyrästä endo- $\beta$ -1,4-glukanaasiaktiivisuudesta nähdään, että osa siitä ei ole tarttunut pylvääseen, koska se on eluoinut läpi näytteensyöttövaiheessa (fraktiot 2-12). Osa on tarttunut ja eluoinut piikkinä jonka huippu on fraktiossa 28. Piikkien alapuoliset pinta-alat eli niiden kokonaisaktiivisuudet ovat suunnilleen samat. Myöhemmän endo- $\beta$ -1,4-glukanaasipiikin (fr. 27-34) kohdalla on myös amylaasiaktiivisuuspiikki. Tarttumattoman läpi tulleen endo- $\beta$ -1,4-glukanaasipiikin kohdalla taas on proteaasiaktiivisuuspiikki. Proteiinipitoisuuskäyrästä nähdään, että suurin osa proteiineista (tai ne joita preparaattissa on eniten) ei ole tarttunut pylvääseen ja on eluoinut ensimmäisen endo- $\beta$ -1,4-glukanaasipiikin fraktioihin 4-12.



Kuva 9 ABM5119 DEAE-Trisacryl anioninvaihtokromatografian fraktioiden määrikykset

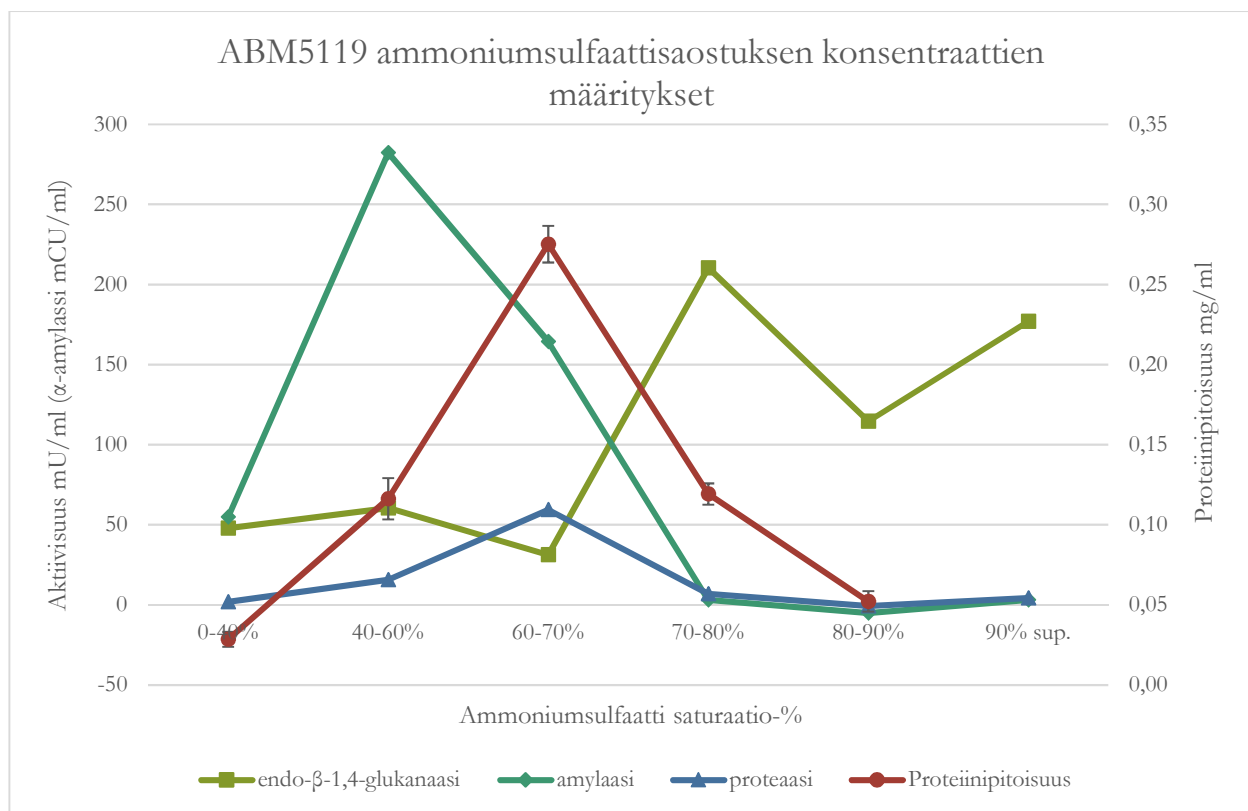
Jälkimmäisen endo- $\beta$ -1,4-glukanaasipiikin (fr. 27-34) kohdalla proteiinipitoisuus on matalampi, ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasiaktiivisuus suuri. Tämän piikin fraktiot yhdistettiin. Kuvan 11 SDS-PAGE analyysistä nähdään, että kaistalla



5 olevassa yhdistetyssä DEAE-fraktiossa on vain yksi vahva ~44 kDa proteiinijuova, kun taas kaistalla kaksi näkyvässä konsentroidussa supernatantissa on useita vahvoja juovia. Siten SDS-PAGE:n ja DEAE-fraktioitten määritysten perusteella preparaatti puhdistui DEAE-kromatografiassa (muttei kokonaan), ja taulukosta 2 nähdäänkin puhdistuskertoimen nouseen 8,3:een.

Ammoniumsulfaattisaostuksessa päästiin eroon lopuistakin kontaminanteista

DEAE-kromatografian fraktioista 27-34 yhdistetylle preparaatille tehtiin ammoniumsulfaattisaostus. Sopivien saturaatioprosenttien löytämiseksi tehtiin esikoe (pilottikoe) jossa saostettiin 10% - 90% saturaatiotasoihin 10% välein ja saatujen fraktioiden aktiivisuudet ja proteiinipitoisuus mitattiin. Tuloksena oli, että amylaasi saostuu 50-60 saturaatio-% pitoisuuksilla, ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi saostuu 70 - 80 saturaatio-% pitoisuuksilla. Tämän perusteella tehtiin varsinainen saostus. Siinä 70-80 sat.-% fraktion supernatantissa havaittiin olevan jonkin verran endo- $\beta$ -1,4-glukanaasiaktiivisuutta, ja saostettiin suunnitelmasta poiketen vielä 90%:iin. Ammoniumsulfaattisaostuksen 0-40, 40-60, 60-70, 70-80, 80-90 saturaatio-% fraktiot konsentroidtiin ja pestiin puskurilla ammoniumsulfaatin poistamiseksi, jotta ne voidaan analysoida SDS-PAGE:ssa. Kuvassa 10 nähdään varsinaisen ammoniumsulfaattisaostuksen konsentroitujen fraktioitten aktiivisuudet ja proteiinipitoisuudet, ja kuvan 11 kaistoilla 9-13 niiden SDS-PAGE.



**Kuva 10** ABM5119 endo- $\beta$ -1,4-glukanaasin puhdistuksen ammoniumsulfaattisaostuksen fraktioitten määritykset (akt. n=1, proteiinipit. n=3). 90 % sup. on 90 sat.-% saostuksesta jäänyt supernatantti

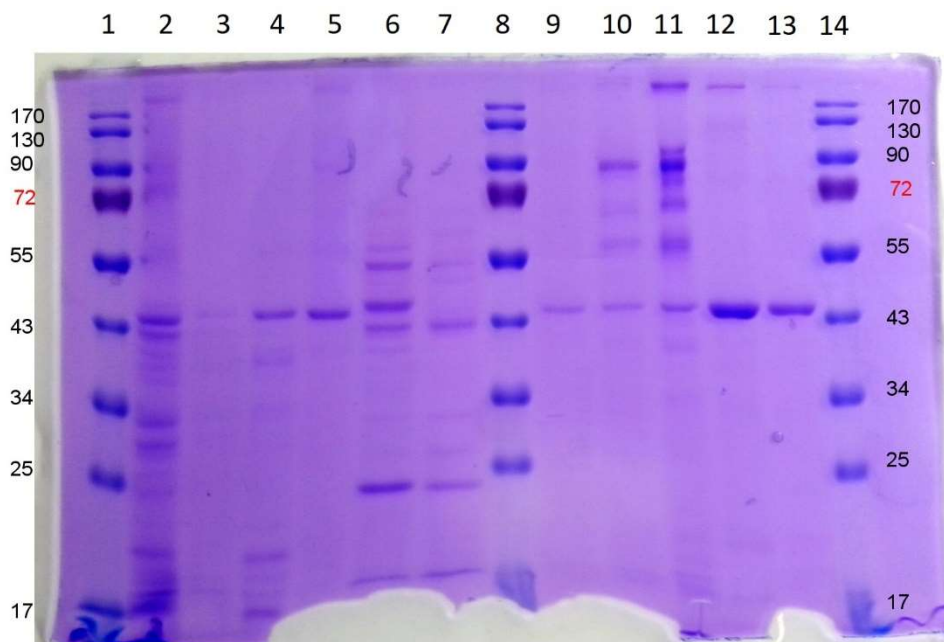
Kuvasta 10 nähdään, että endo- $\beta$ -1,4-glukanaasia on saostunut eniten 70-80 ja 80-90 saturaatio-% fraktioihin, ja jäänyt 90 % fraktion supernatanttiin, mutta jonkin verran myös matalampien ammoniumsulfaattipitoisuuksien fraktioihin.  $\alpha$ -amylaasi on saostunut lähinnä 40-60 saturaatio-% välillä, ja siitä loputkin 70 saturaatio-% mennessä. Proteaasi ja suurin

osa proteiinista on saostunut 60-70 saturaatio-% välillä, eikä proteaasia ole korkeammilla ammoniumsulfaattipitoisuuksilla. Vaikka kuvan 10 konsentraattien aktiivisuusmääritykset tehtiin vain yhdellä reaktiolla, niin konsentroimattomista tehdyssä määrittelyssä n=3 ja saatiin samanlainen tulos. Tätä määrittystä ei ole näkyvissä.

Tämä jälkeen ammoniumsulfaattisaostuksen fraktioille tehtiin SDS-PAGE, jonka tulos on esitetty kuvassa 11. Niissä kaikissa (kaistat 9-13) on ~44 kDa proteiinijuova. Se on vahvin 70-80 saturaatio-% fraktiossa (kaista 12). 40-60 ja 60-70 saturaatio-% (kaistat 10 ja 11) fraktioissa on runsaasti muitakin proteiineja. 80-90 % saturaatio-% fraktiossa (kaista 13) on lähinnä tätä ~44 kDa proteiinia, ja hieman jotain yli 170 kDa proteiinia. Tulosten tarkastelussa on arvioitu miten hyvin puhdistus onnistui.

**Taulukko 2 ABM5119  $\beta$ -1,4-endoglukanaasin puhdistuksen eteneminen**

fraktio	tilavuus (ml)	poistot (ml)	proteiini-pitoisuus $\mu\text{g/ml}$	proteiinia $\mu\text{g}$	korjaus-kerroin poistoista	aktiivisuus mU/ml	spesifinen aktiivisuus mU/ $\mu\text{g}$	kokonaisaktiivisuus mU	puhdistus kerroin	saanto
Supernatantti	75	1,00	189 $\pm$ 13	14175	1	81 $\pm$ 3	0,43	6075	1,0	100 %
Ultrasuodattamalla konsentroidu sup.	3,5	0,60	2024 $\pm$ 447	7084	1,014	2244 $\pm$ 375	1,11	7854	2,6	131 %
DEAE yhdistetty sitoutunut fraktio	8,1	1,31	63 $\pm$ 12	535	1,224	191 $\pm$ 16	2,89	1547	8,3	31 %
AS 80-90% konsentroidu	0,2	0,063	52 $\pm$ 6	10	1,586	115	2,21	23	8,2	0,6 %

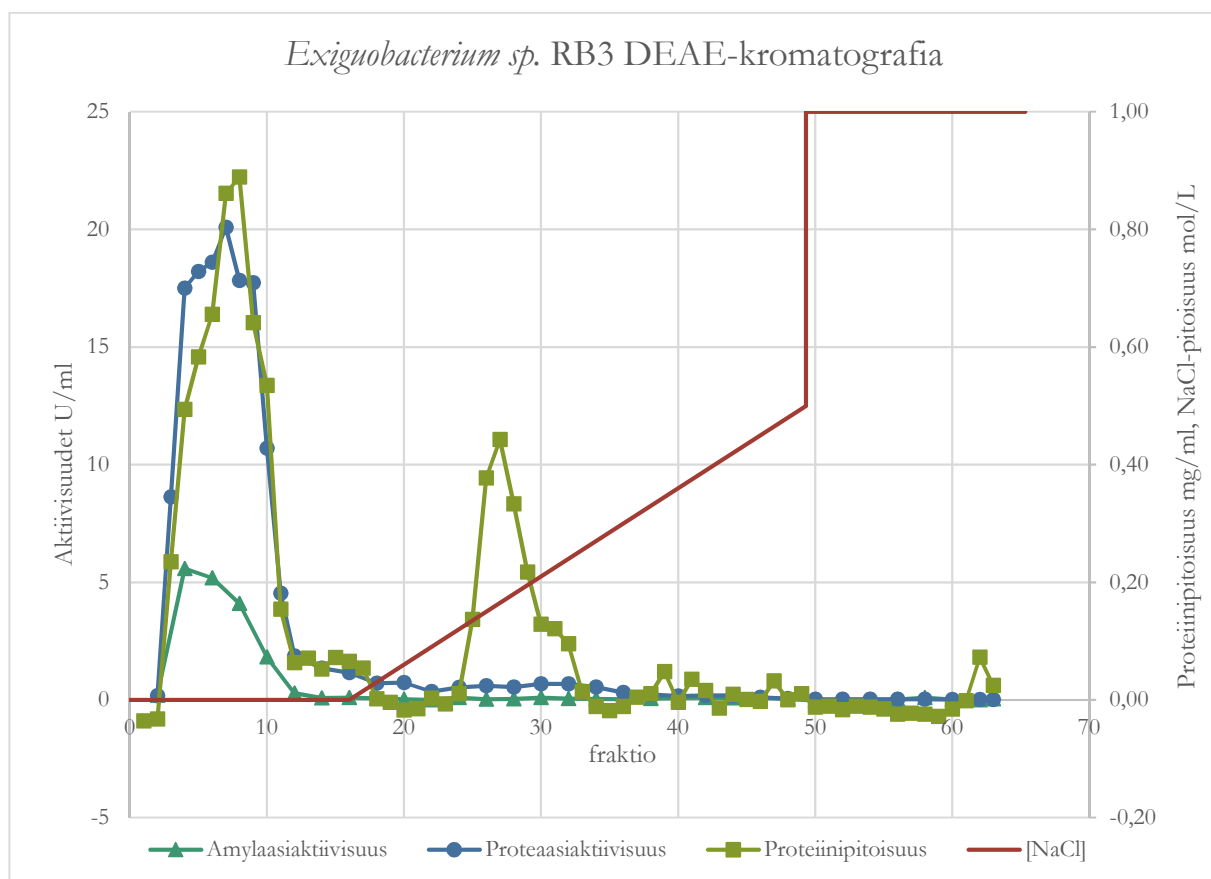


Kuva 11 ABM5119 endo- $\beta$ -1,4-glukanaasin puhdistuksen toinen SDS-PAGE. Kaistat: 1, 8 ja 14: PageRuler molekyylipainostandardit (Fermentas), 2: konsentroidu kasvatuliemen supernatantti, 3: tyhjä, 4 DEAE fraktio 6, 5: DEAE-fraktioista 27-34 yhdistetty preparaatti, 6: DEAE fr. 38, 7: DEAE fr. 35, 9-13: ammoniumsulfaattisaostuksen 0-40 %, 40-60 %, 60-70%, 70-80 ja 80-90% fraktioiden konsentraatit. Numerot laidoilla ovat standardien molekyylipainot kilodaltoneina (kDa)

*Exiguobacterium sp.* RB3 kannasta onnistuttiin puhdistamaan sekä  $\alpha$ -amylaasi että proteaasi. Kuten *Bacillus sp.* ABM5119 endo- $\beta$ -1,4-glukanaasin puhdistuksessa, kasvatuksen liemi sentrifugoitiin bakteerien poistamiseksi, ja saatu supernatantti konsentroitiin ja pestiin DEAE-kromatografian puskurilla. Taulukosta 3 nähdään, että konsentroidin- ja pesuvaiheessa kokonaisproteiinimäärä laski noin kolmasosaan ja puhdistuskerroin nousi 1,9:ään. Myös  $\alpha$ -amylaasin kokonaisaktiivisuus laski, kuten taulukosta 3 nähdään.

### DEAE-kromatografia

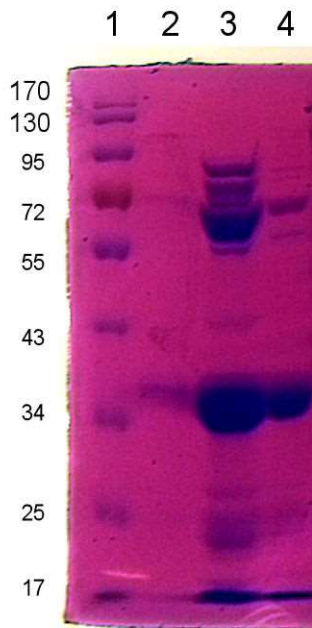
Konsentroidulle ja pestylle supernatantille tehtiin DEAE-kromatografia, jonka fraktioiden määritykset nähdään kuvassa 12. Kuten kuvasta 12 nähdään,  $\alpha$ -amylaasi ja proteaasi eluoiutuivat kromatografian alussa, ennen NaCl-pitoisuusgradientin alkua. Noin kolmasosa muista proteiineista eluoiutui 150 mM – 250 mM suolapitoisuudella.  $\alpha$ -amylaasiaktiiviset fraktiot 3-12 yhdistettiin ja niillä jatkettiin puhdistusta.



**Kuva 12 DEAE-kromatografian fraktioiden aktiivisuudet, ja proteiinipitoisuudet**

Kuvissa 13 ja 15 nähdään SDS-PAGE analyysit kasvatusliemen supernatantista (kaista kaksi), konsentroidusta ja puskurilla pestystä preparaattista (kaista kolme), ja DEAE kromatografian yhdistetystä fraktiosta (kaista neljä). Kuvan 13 kaistalla kaksi nähdään vain noin 37, 72 ja 100 kDa proteiinijuovat. Kuvien 13 ja 15 kaistoilla kolme nähdään näiden lisäksi useita muita juovia. Kuvien 13 ja 15 kaistoilla neljä on varsinkin 55 – 95 kDa välillä vähemmän proteiinijuovia kuin kuvien kaistoilla kolme, eli DEAE-kromatografiassa poistui tämän molekyylipainoisia proteiineja. Taulukossa 3

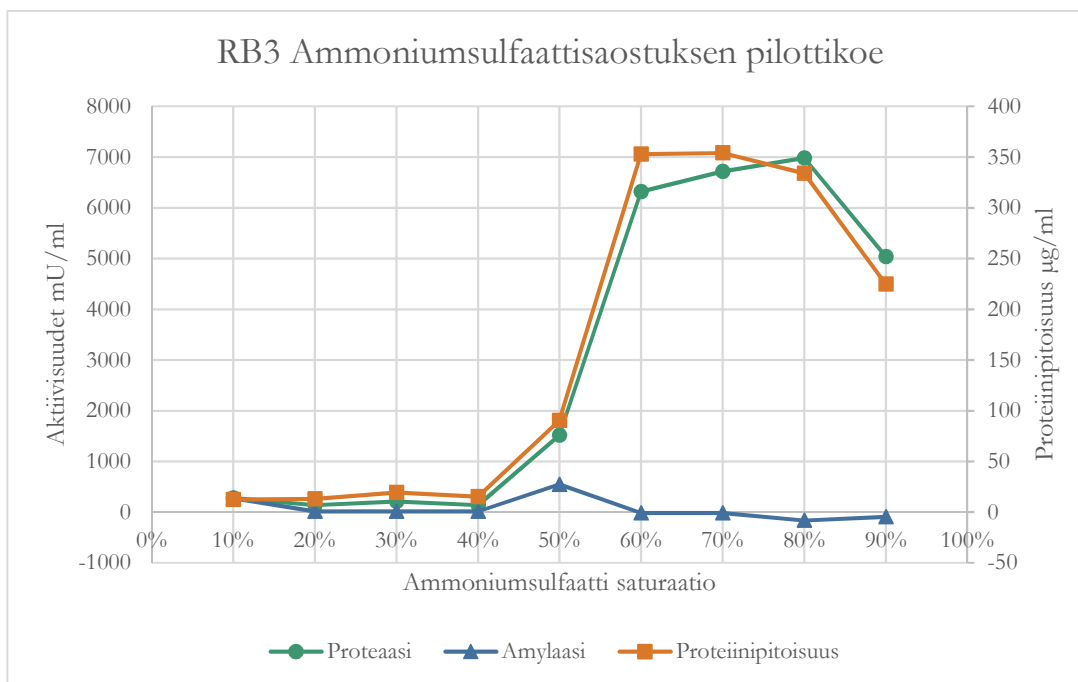
nähdään että DEAE-kromatografiassa puhdistuskerroin nousi 3,2:een. Tulosten tarkastelussa on arvioitu DEAE-kromatografian toimintaa.



Kuva 13 (vasemmalla) *Exiguobacterium sp.* RB3  $\alpha$ -amylaasin puhdistuksen SDS-PAGE. Kaistat: 1 PageRuler molekyylipainostandardi jonka vasemmalla puolella sen molekyylipainot (kDa), 2 kasvatusliemen supernatantti, 3 konsentroitunut ja puskurilla pesty kasv. liemen supernatantti, 4 DEAE-kromatografian amylaasifraktioista yhdistetty. Geeli punertaa koska se on amylaasisyntogrammin Coomassie värjätty puoli ja siten sisältää atsovärjättyä tärkkelystä (Red Starch)

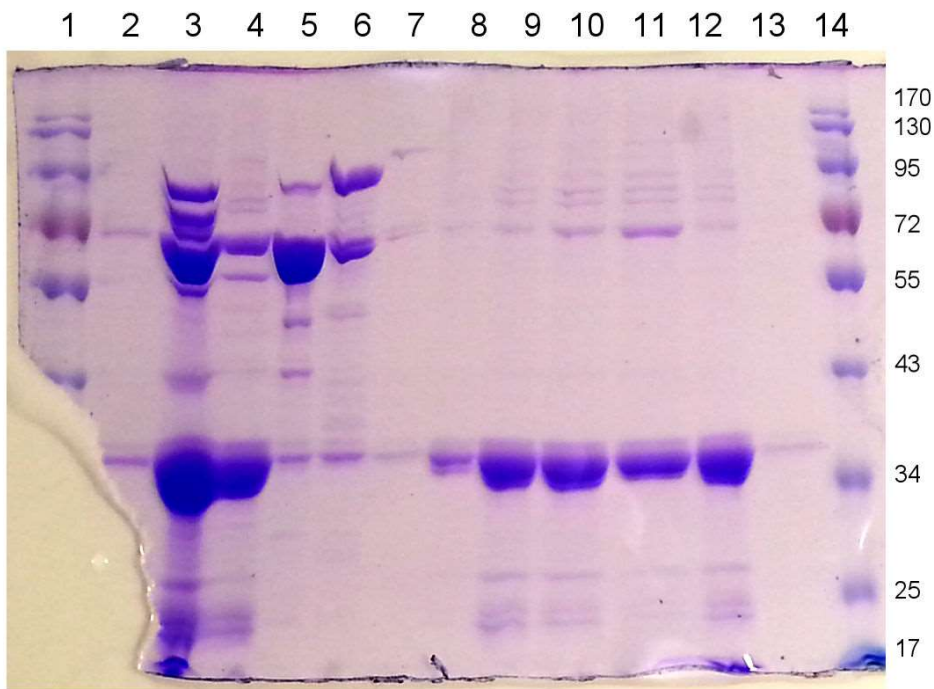
Ammoniumsulfaattisaostuksen pilottikokeesta saatiin proteaasia

Ammoniumsulfaattisaostusta kokeiltiin pienellä määrällä DEAE yhdistettyä fraktioita. Kuvassa 14 nähdään saostuksen pilottikokeen fraktioiden aktiivisuudet ja proteiinipitoisuus. Siitä nähdään, että  $\alpha$ -amylaasiaktiivisuutta on vähän 50 saturatio-% fraktiossa, eikä muilla pitoisuuksilla. Proteaasiaktiivisuutta on hieman 50 saturatio-% fraktiossa ja reilusti 60-90 saturatio-%, fraktioissa. Proteiinipitoisuus kehittyy kuten proteaasiaktiivisuus.



Kuva 14 RB3  $\alpha$ -amylaasin puhdistuksen ammoniumsulfaattisaostuksen pilottikokeen fraktioiden määritykset

Kuvan 15 kaistoilla 7-11 nähdään tämän ammoniumsulfaattisaostuksen 40,50, 60, 70, ja 90 saturatio-% fraktioiden SDS-PAGE.

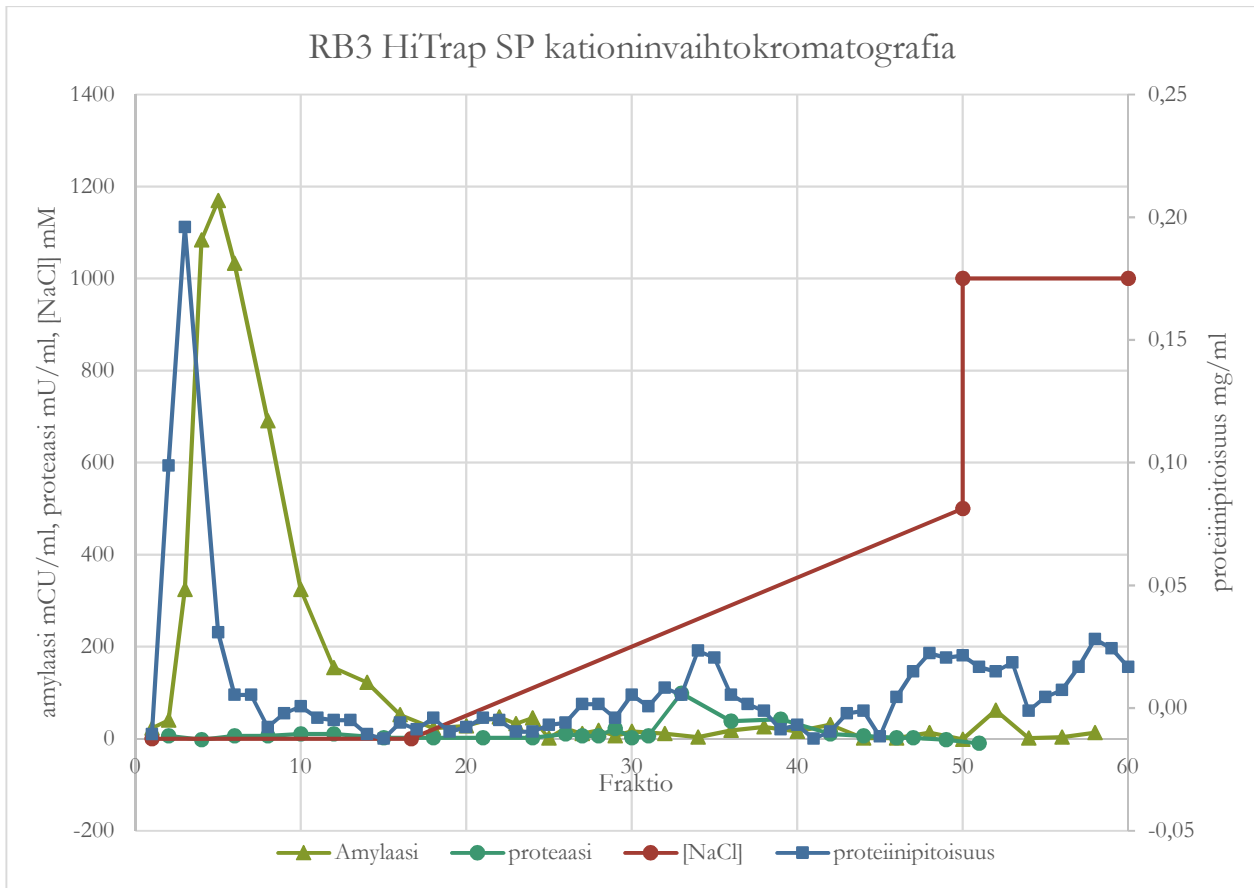


Kuva 15 *Exiguobacterium sp.* RB3  $\alpha$ -amylaasin puhdistuksen toinen SDS-PAGE. Kaistat: 1 ja 14: PageRuler molekyylipainostandardit joiden molekyylipainot (kDa) merkitty kuvan oikeaan laitaan, 2: kasvatusliemen supernatantti, 3: konsentroidu ja puskurilla pesty kasv. liemen supernatantti, 4: DEAE-kromatografian amylaasifraktioista yhdistetty, 5: DEAE fraktio 27, 6: DEAE fr. 30, 7-11: Ensimmäisen Ammoniumsulfatastusaostuksen sakat 40, 50, 60, 70, ja 90 saturaatio-% asti saostuksista, 12 ja 13: toisen Am.Sulf. saostuksen 60 ja 90 saturaatio-% sakat

Selvästi vahvin proteiinijuova on noin 37 kDa, ja kuvan 14 proteaasiaktiivisuus ja proteiinipitoisuus korreloivat tämän juovan paksuuden kanssa. Missään fraktioista ei nähdä noin 60 kDa juovaa. Jonkin noin 70 kDa proteiinin saostuminen on lisääntynyt ammoniumsulfatipitoisuuden kasvaessa. Ammoniumsulfatastusta yritettiin uudelleen saostamalla 60 %:iin ja sitten 90 %:iin. Tulos oli silloinkin samalainen kuin kuvassa 14. Uusintasaostuksen fraktioiden SDS-PAGE nähdään kuvan 15 kaistoilla 12 ja 13. Tulosten tarkastelussa kerrotaan, miten ammoniumsulfatastuksen arvioitiin toimineen.

#### HiTrap sulfopropyli (SP) -kationinvaihtokromatografiassa $\alpha$ -amylaasi puhdistui

Seuraavaksi DEAE kromatografian fraktioista 3-12 yhdistetylle preparaatile tehtiin kationinvaihtokromatografia, ja sen fraktioiden määritykset nähdään kuvassa 16.  $\alpha$ -mylaasi on eluoitunut fraktioihin 3-14, ja  $\alpha$ -amylaasiaktiivisuus on huipussaan fraktiossa viisi. Nähdään, että proteiinipitoisuuspiikki on heti eluution alussa fraktioissa 2-5. Se edeltää  $\alpha$ -amylaasiaktiivisuuspiikkiä vaikka onkin sen kanssa osittain päällekkäinen. Se mitä proteaasiaktiivisuudesta on jäljellä, on eluoitunut myöhemmin lähinnä fraktioon 33. Jonkin verran proteiinia on eluoitunut fraktioissa 30-37. Tästä kromatografiasta päätettiin yhdistää fraktiot 5-10 puhdistetuksi  $\alpha$ -amylaasiksi.

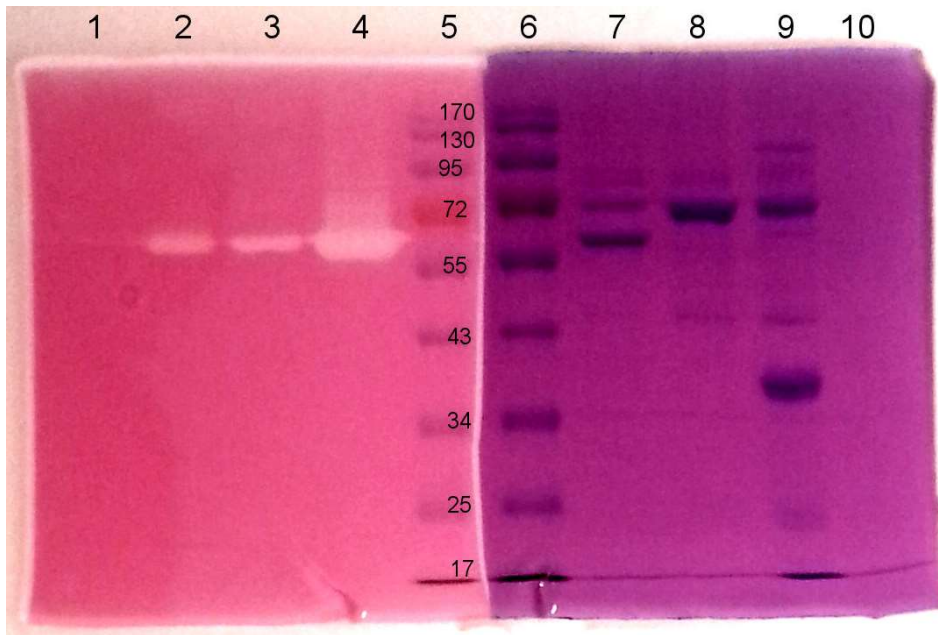


Kuva 16 RB3 kannan  $\alpha$ -amylaasin puhdistuksen HiTrap SP kationinvaihtokromatografian fraktioiden aktiivisuudet ja proteiinipitoisuus, sekä eluutin NaCl-pitoisuus

Taulukosta 3 nähdään  $\alpha$ -amylaasin puhdistuksen eteneminen eri vaiheissa. Konsentroidussa saavutettiin 1,9-kertainen puhdistuminen. DEAE-Trisacryl-anioninvaihtokromatografiassa preparaatti puhdistui lisää ja puhdistuskerroin oli sen jälkeen 3,2. DEAE-kromatografian jälkeen puhdistus keskeytettiin ja siitä yhdistetty  $\alpha$ -amylaasifraktio pakastettiin. Sulatuksen jälkeen kokonaisaktiivisuus oli huomattavasti pienempi kuin ennen sulatusta. HiTrap-sulfopropyyli-kationinvaihtokromatografialla saatiin aikaan merkittävä puhdistuminen valitsemalla lopulliseen preparaattiin yhdistettävät fraktiot tarkasti ja sen jälkeen puhdistuskerroin oli 123, ja puhdistetun preparaatin spesifinen aktiivisuus 319 CU/mg.

Taulukko 3 *Exiguobacterium sp.* RB3  $\alpha$ -amylaasin puhdistuksen eteneminen

fraktio	tilavuus (ml)	proteiinipitoisuus $\mu\text{g/ml}$	proteiinia $\mu\text{g}$	korjaus kerroin	aktiivisuus CU/ml	spesifinen aktiivisuus CU/mg	kokonaisaktiivisuus CU	puhdistuskerroin	saanto
kasvatusliemen supernatantti	484	63,9	30928	1	0,191	3,0	92	1	100 %
konsentroituu pesty sup.	5,4	2074	11200	1,002	11,6	5,6	63	1,9	68 %
DEAE yhdistetty	13,5	733	9896	1,041	6,72	9,2	91	3,2	98 %
DEAE yhd. sulatettu konsentroituu	1,5	n/d	n/d	1,149	8,06		12		13 %
HiTrap SP yhdistetty	7,20	5,4	39	1,153	1,72	319	12	123	13 %



Kuva 17 *Exiguobacterium sp.* RB3  $\alpha$ -amylaasi puhdistuksen SDS-PAGE ja  $\alpha$ -amylaasitsymogrammi Red Starch substraatilla. Vasen geelipuolisko eli kaistat 1-5 tsymogrammi, oikea geelipuolisko (kaistat 6-10) Coomassie Blue värjätty. Kaistat 2 ja 9: konsentroidu kasvatusliemen supernatantti, kaistat 3 ja 8: HiTrap kromatografian fraktio 3, kaistat 4 ja 7: HiTrap HiTrap kromatografian fraktioista 5 - 10 yhdistetty amylaasipreparaatti, kaistat 5 ja 6: PageRuler prestained molekyylipainostandardi, sekä kaistat 1 ja 10: tyhjä. Kaistojen 5 ja 6 välissä olevat numerot ovat standardien molekyylipainot kilodaltonneina.

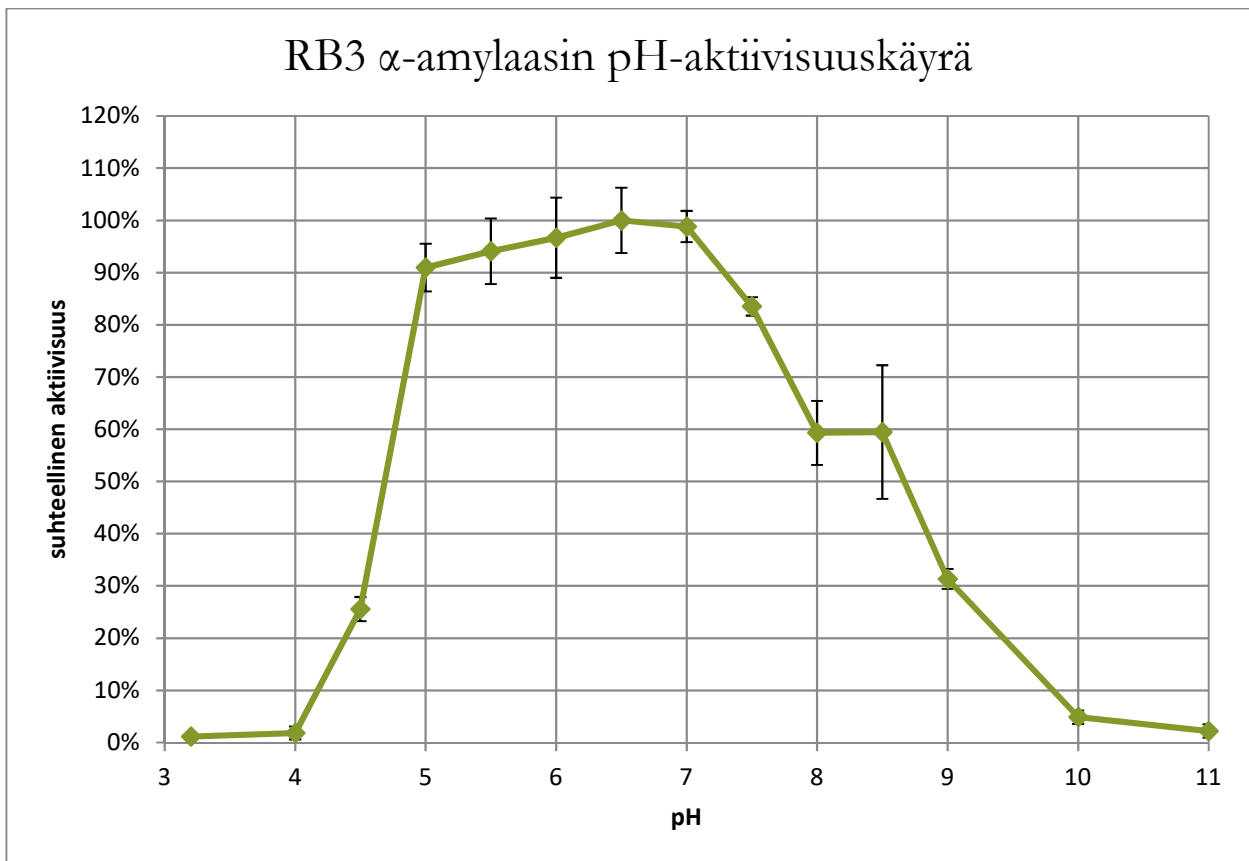
Pienellä määrällä DEAE-yhdistettyä fraktiota tehty pakastus ja sulatus -koe antoi tulokseksi, että  $\alpha$ -amylaasiaktiivisuudesta on jäljellä 71% pakastuksen ja sulatuksen jälkeen. Tulosten tarkastelussa on arvioitu, miten tämä liittyy DEAE-kromatografian yhdistetyn fraktion aktiivisuuden ja saannon alenemiseen sulatuksessa.

Kationinvaihtokromatografian jälkeen tehtiin vielä toinen SDS-PAGE ja  $\alpha$ -amylaasitsymogrammi, jonka tulos nähdään kuvassa 17. Kuvan 17 kaistoilla 2 – 4 näkyy noin 60 kDa kohdalla vaaleammat juovat, joista Red Starch on hajonnut, eli niiden kohdalla on  $\alpha$ -amylaasia. Kaistalla 7 näkyy 60 kDa kohdalla sinertävä proteiinijuova, joka on vahvin sen kaistan juovista. Sitä arvioitiin olevan noin 60 % kaistan 7 proteiineista, eli noin 60 % puhdistetun preparaatin proteiineista oli  $\alpha$ -amylaasia.

### *Exiguobacterium sp.* RB3 $\alpha$ -amylaasin turnover number eli $k_{cat}$ vakio

HiTrap fraktioista yhdistetyn preparaatin spesifinen aktiivisuus oli 319 CU/mg, ja preparaatus arvioitiin olevan 60 % amylaasia. Näiden tietojen avulla voidaan laskea, että jos  $\alpha$ -amylaasi olisi täysin puhdas niin sen spesifinen aktiivisuus olisi  $319 \text{ CU/mg} / 0,60 = 532 \text{ CU/mg}$ . Yksi CU tarkoittaa yksi mikromooli katkaistuja sidoksia minuutissa. Preparaatin aktiivisuus 1,72 CU/ml on SI-yksiköinä 0,00172 mol/L/s eli kat/s. Käyttämällä aminohapposekvenssistä saatua molekyylipainoa eli 54,4 kDa saatiin proteiinin pitoisuudeksi  $5,956 \cdot 10^{-8} \text{ mol/l}$ , tästä ja em. aktiivisuudesta voitiin laskea turnover number, joka oli 29000 1/s. Tulosten tarkastelussa tätä verrataan kirjallisuudessa esiintyviin arvoihin.

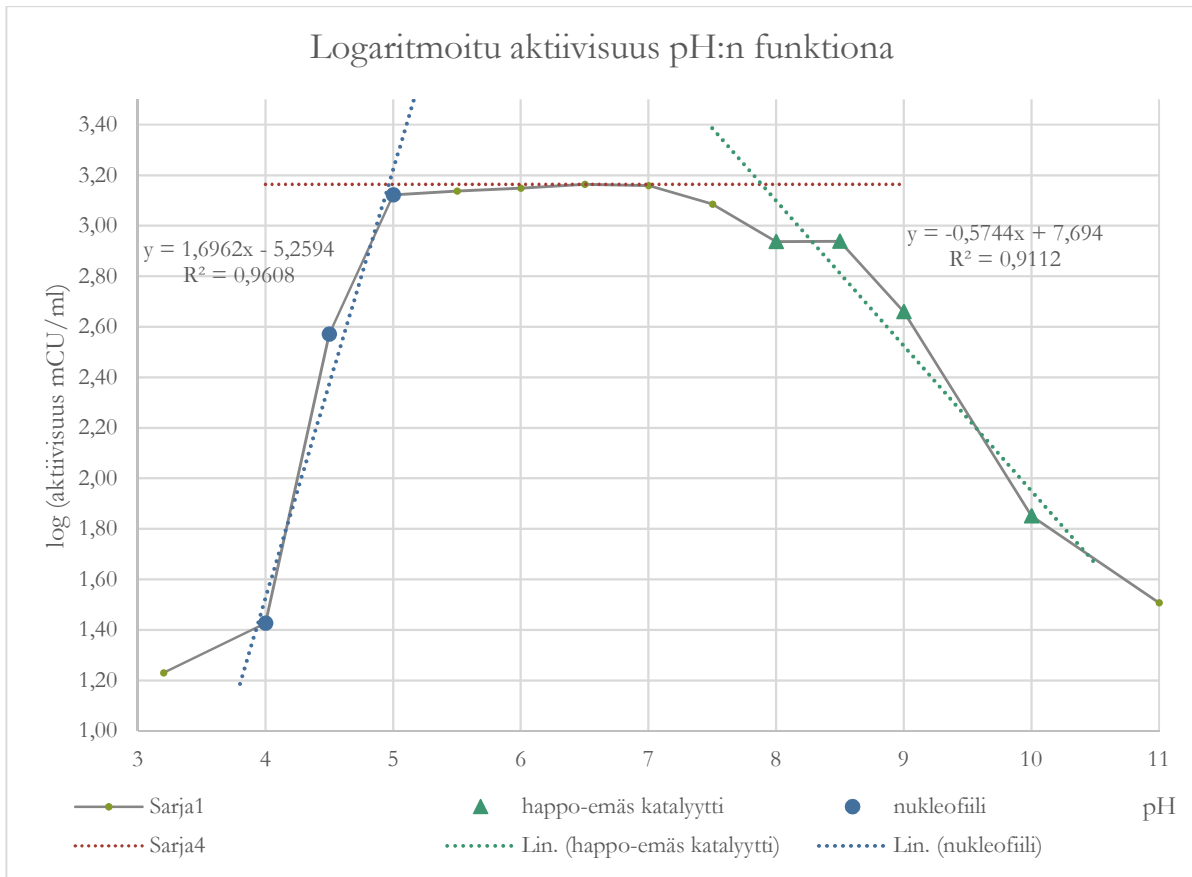
$\alpha$ -amylaasi on aktiivisimmillaan pH:ssa 5 – 7,5



Kuva 18 RB3  $\alpha$ -amylaasin aktiivisuus pH:n funktiona. Huipun aktiivisuus on 1,46 CU/ml. Virhepalkit vastaavat yhtä keskihajontaa kyseisen pH:n reaktioissa (n=3)

Kuvassa 18 on esitetty RB3  $\alpha$ -amylaasin aktiivisuus eri pH:ssa. Siitä nähdään, että huippuaktiivisuus saavutetaan pH:ssa 6,5 ja aktiivisuus pysyy yli 80 %:ssa huippuaktiivisuudesta pH alueella 5,0 – 7,5. pH 8,5 reaktioista yhdessä on muita kahta suurempi aktiivisuus minkä takia keskihajonta pH 8,5 aktiivisuudessa on suurempi, ja käyrä ei laske tasaisesti siirryttäessä neutraalista kohti emäksisempää pH:ta. Nähdään että käyrän vasen laita on jyrkempi kuin oikea laita.



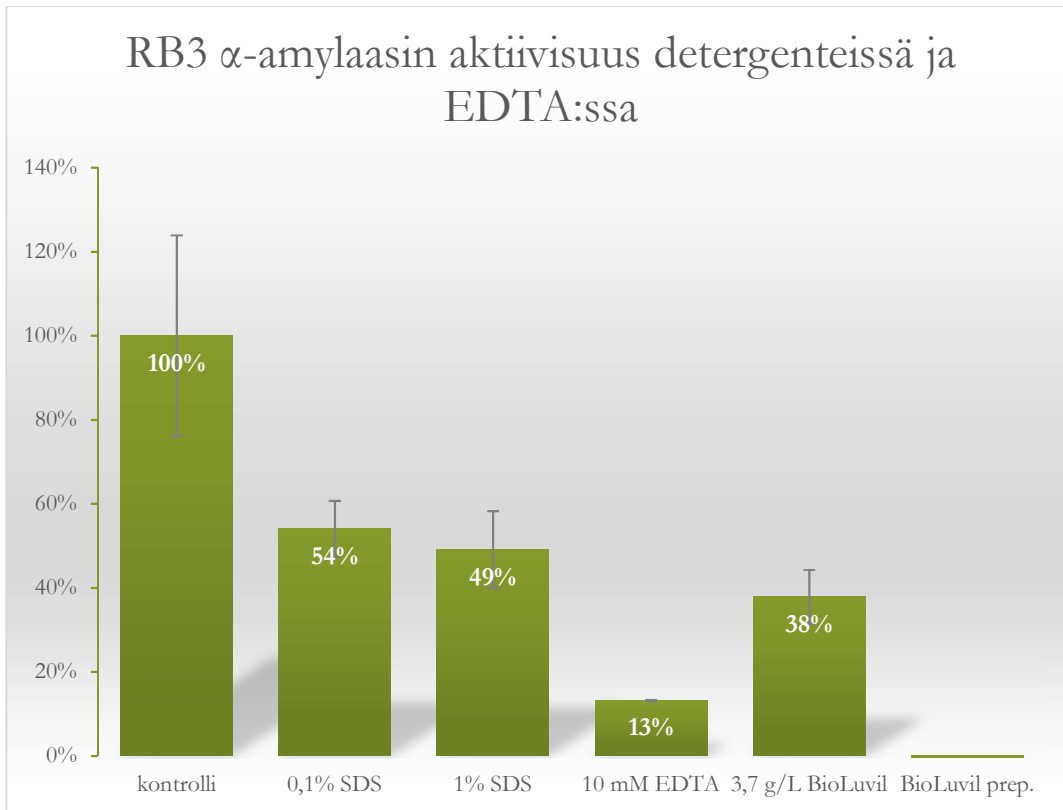


**Kuva 19** *Exiguobacterium sp. RB3*  $\alpha$ -amylaasin logaritmoitu aktiivisuus pH funktiona katalyyttisten aminohappojen pKa:n laskemista varten. Vaakasuora viiva on piirretty huipun logaritmoidun aktiivisuuden 3,16 kohdalle

Entsyymi-substraatti – kompleksin katalyyttisten ryhmien, tässä tapauksessa Asp ja Glu sivuketjujen, pKa:t voidaan laskea logaritmoimalla pH-aktiivisuuskäyrä (Voet & Voet 2004, 487). Käyrän nousevasta ja laskevasta osasta piirretään tai lasketaan suorat kohti huipun kautta vedettyä vaakasuoraa ja näiden leikkauspisteet ovat pKa-arvot entsyymi-substraatti – kompleksille. Tällainen analyysi on esitetty kuvassa 19. Kuvan 19 pH alueelta 8-10 laskettiin kuvassa 19 oikealla puolella näkyvällä yhtälöllä ja huipun log aktiivisuudella 3,16 ylemmän eli amylaaseissa happo-emäs katalyytin pKa:n olevan 7,9. pH 4-5 arvoista saatiin yhtälö jolla laskettiin vastaavasti nukleofiilin pKa:ksi 5,0.

### Kelaattori alentaa $\alpha$ -amylaasin aktiivisuutta ja $\alpha$ -amylaasi sietää detergenttejä

Koska  $\alpha$ -amylaaseissa yleensä on kofaktorina kalsium, joka vaikuttaa niiden rakenteen kautta aktiivisuuteen, haluttiin mitata mikä on kelaattorin (EDTA) vaikutus RB3 kannan  $\alpha$ -amylaasin aktiivisuuteen. Detergenttien sietoa tutkittiin sen selvittämiseksi olisiko RB3 kannan  $\alpha$ -amylaasilla potentiaalia teollisiin sovelluksiin.



**Kuva 20** *Exiguobacterium sp.* RB3  $\alpha$ -amylaasin aktiivisuus detergenteissä ja etyleenidiamiinitetraasetaatissa (EDTA). Virhepalkit ilmaisevat 95% luottamusväliä (n=3). Kontrolli on RB3  $\alpha$ -amylaasin aktiivisuus ilman detergentejä tai EDTA:ta, 3,7 g/L BioLuvil: RB3  $\alpha$ -amylaasin aktiivisuus BioLuvil detergenttipreparaatissa, BioLuvil prep.:  $\alpha$ -amylaasiaktiivisuus 3,7 g/L BioLuvil detergenttipreparaatissa johon ei lisätty RB3  $\alpha$ -amylaasia, eli BioLuvil preparaatin kontrollireaktio

Kuvasta 20 nähdään, että RB3 kannan  $\alpha$ -amylaasin aktiivisuus kelaattorin eli EDTA:n läsnä ollessa on 13 % kontrollista. Aktiivisuus SDS-detergentissä 0,1 % ja 1 % pitoisuuksilla on noin puolet kontrollista jossa ei ole mitään lisäaineita. 0,1 % ja 1 % SDS-pitoisuuksien aktiivisuuksilla ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa. BioLuvil pyykinpesuaineen entsyymit oli denaturoitu keittämällä kuten metodeissa kuvattu. RB3 kannan  $\alpha$ -amylaasin aktiivisuus 3,7 g/L BioLuvilissa oli 38 % kontrollista. Keitetystä BioLuvil detergenttipreparaatissa ei ollut  $\alpha$ -amylaasiaktiivisuutta, kuten nähdään kuvan 20 BioLuvil prep. määrittämisestä. pH kaikissa määrittämisissä oli 7,0 (ei esim. BioLuvilin pH).

### Kaurakuituvellin viskositeetikokeisiin käytettyjen entsyymipreparaattien aktiivisuudet

Tässä työssä puhdistettujen endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi- ja  $\alpha$ -amylaasipreparaattien sisältämät aktiivisuudet on koottu taulukkoon neljä selvyden vuoksi. Puhdistamattomista Denimax, Aquazym, Lysing enzyme (teollisuus)entsyymipreparaateista selvitettiin entsyymimäärittäyksillä (taulukko 4) ja tsymografioilla (kuvat 21 ja 22), mitä aktiivisuuksia ne sisältävät, koska niiden epäiltiin sisältävän muitakin kuin ilmoitettuja aktiivisuuksia, koska mm. Mathlouthi ym. (2002) käyttämässä entsyymipreparaateissa oli merkittäviä sivuaktiivisuuksia.

Preparaatti	Aktiivisuudet mU/ml, $\alpha$ -amylaasi mCU/ml			
	$\alpha$ -amylaasi	endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi	ksylanaasi	proteaasi
Lysing enzyme 1 mg/ml	56	544	n/d	>75
Denimax 10 mg/ml	1	590	3300	86
Aquazym 20 mg/ml	98000	<~70	720	148
puhdistettu <i>Exiguobacterium</i> sp. RB3 $\alpha$ -amylaasi	1100 $\pm$ 100	0	0	6 $\pm$ 4
puhdistettu ABM5119 endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi	0 $\pm$ 3	115	0	0 $\pm$ 4
ABM5119 DEAE-fraktio 7	1 $\pm$ 1	74	0	56

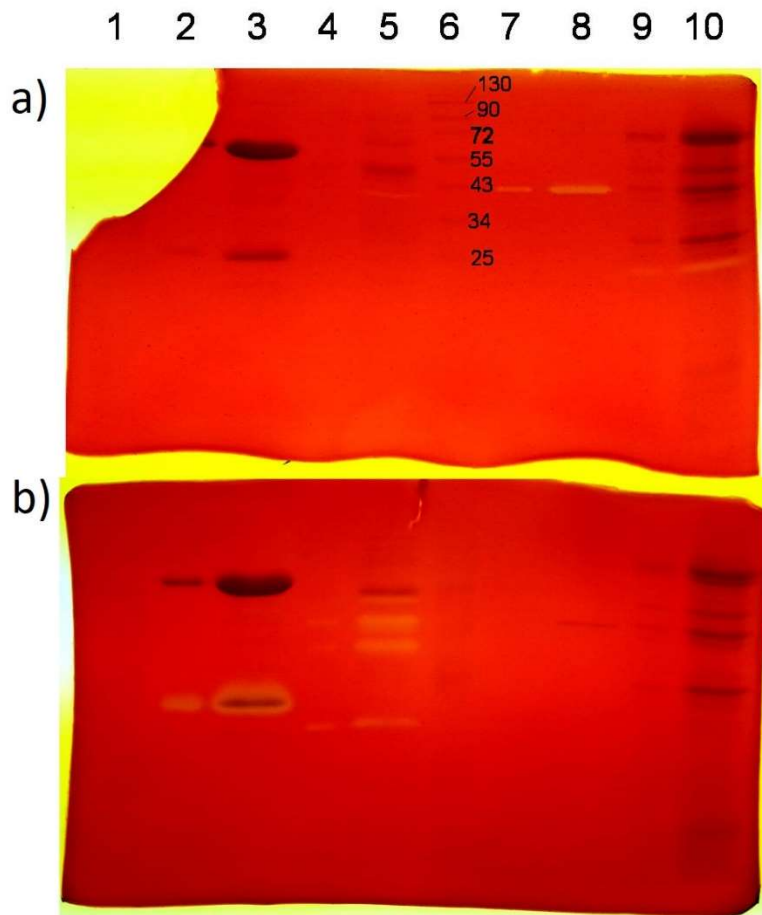
Taulukko 4 Kaupallisten entsyymipreparaattien aktiivisuudet

Kuvan 21 tsymogrammigeleissä proteiinijuovat näkyvät tummina, substraatin hydrolyysi oranssina, ja geelin tausta punaisena. Kuvissa 21 a ja b kaistoilla kaksi ja kolme nähdään Aquazym preparaattista tulleen kaksi tummaa juovaa, eli proteiinijuovaa kummallakin geelillä. Kuvassa 21 b kaistojen 2 ja 3 alemmaa proteiinijuovaa ympäröi oranssi kehä, mikä indikoi ksylaanin hydrolyysiä. Tämä juova (kaistalla kolme) on 25 kDa ja 34 kDa standardien (kaista 6) välissä noin 30 kDa kohdalla. Kuvan 22 a Red Starch amylaasitsymogrammissa kaistalla seisemän Aquazymistä on tullut vahva noin 60 kDa hydrolyysijuova tai -alue, ja kuvassa 22 b samaan kohtaan proteiinijuova. Kuvassa 22 kaistalla 7 näkyy joitain muitakin heikkoja proteiinijuovia 55 ja 43 kDa standardien (kaista 1) välisellä alueella.

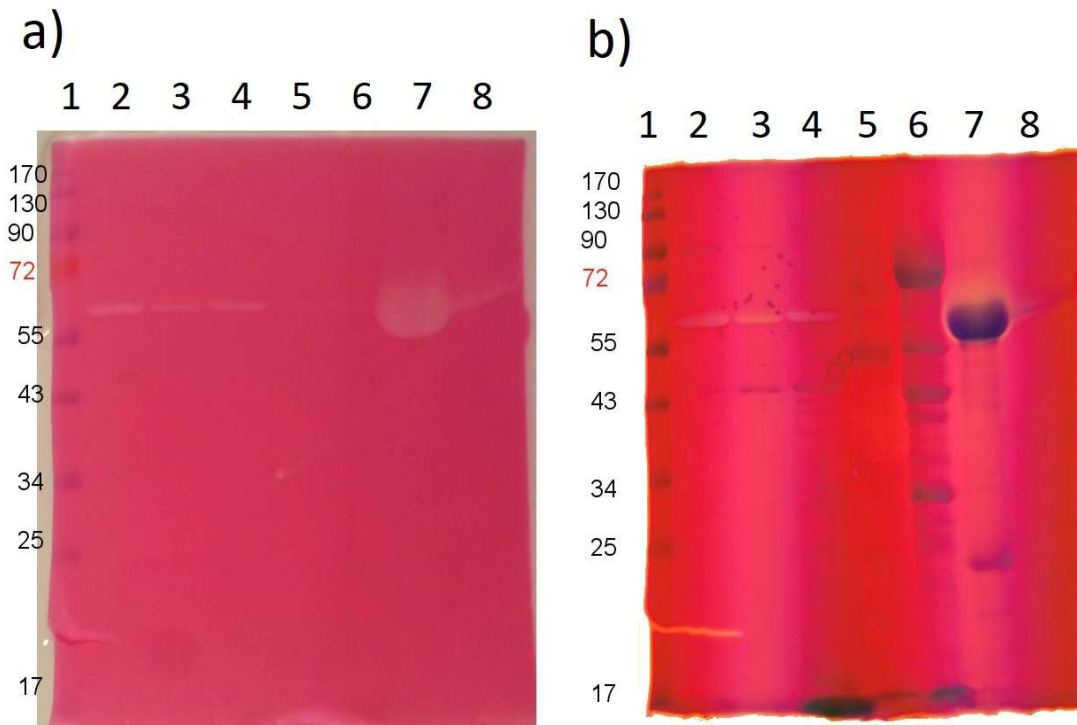
Kuvan 21 a CMC-tsymogrammigeelin kaistalla viisi, jossa Denimax preparaatti, nähdään yksi hyvin heikko oranssi hydrolyysijuova vähän 43 kDa standardin (kaista 6) alapuolella. Kuvan 21 b ksylaanitsymogrammissa kaistalla viisi siitä on tullut näkyviin muutamia tummia proteiinijuovia ja neljä oranssia hydrolyysijuovaa. Kuvan 22  $\alpha$ -amylaasitsymogrammissa ei nähdä Denimaxin kaistalla viisi selvää hydrolyysijuovaa.

Kuvan 21 a CMC-tsymogramissa kaistoille 7 ja 8 tullut oranssit hydrolyysijuovat noin 43 kDa kohdalle CMC-geeliin, mutta kuvan 21 b ksylaanigeelissä näitä ei ole, eikä muitakaan hydrolyysijuovia. Kuvan 21 b ksylaanigeelissä kaistalla 8 heikko proteiinijuova noin 43 kDa kohdalla, muttei hydrolyysijuovaa. *Bacillus* sp. ABM5119 puhdistuksen yhdistetyssä DEAE-fraktiossa havaitaan siis hydrolyysijälki samassa kohtaa kuin kuvan 8 CMC-tsymogramissa, ja ei havaita ksylaanin hydrolyysiä. Kuvan 22 a Red Starch tsymogrammigeelissä kaistoilla 2, 3 ja 4 nähdään ABM 5119 puhdistuksen eri preparaattien kaistoilla noin 60 kDa hydrolyysijuova, joka näkyy geelin taustaa vaaleampana.

Lysing enzymestä on tullut kuvan 21 a kaistoille 9 ja 10 noin 25 kDa kohdalle vaaleat hydrolyysijuovat, mutta kuvassa 21 b ei ole hydrolyysijuovia. Kuvissa 21 a ja b kaistalla 10, sekä 22 b kaistalla 6 nähdään useita tummia proteiinijuovia. Kuvan 22 a kaistalla 6 ei nähdä hydrolyysijuovia.



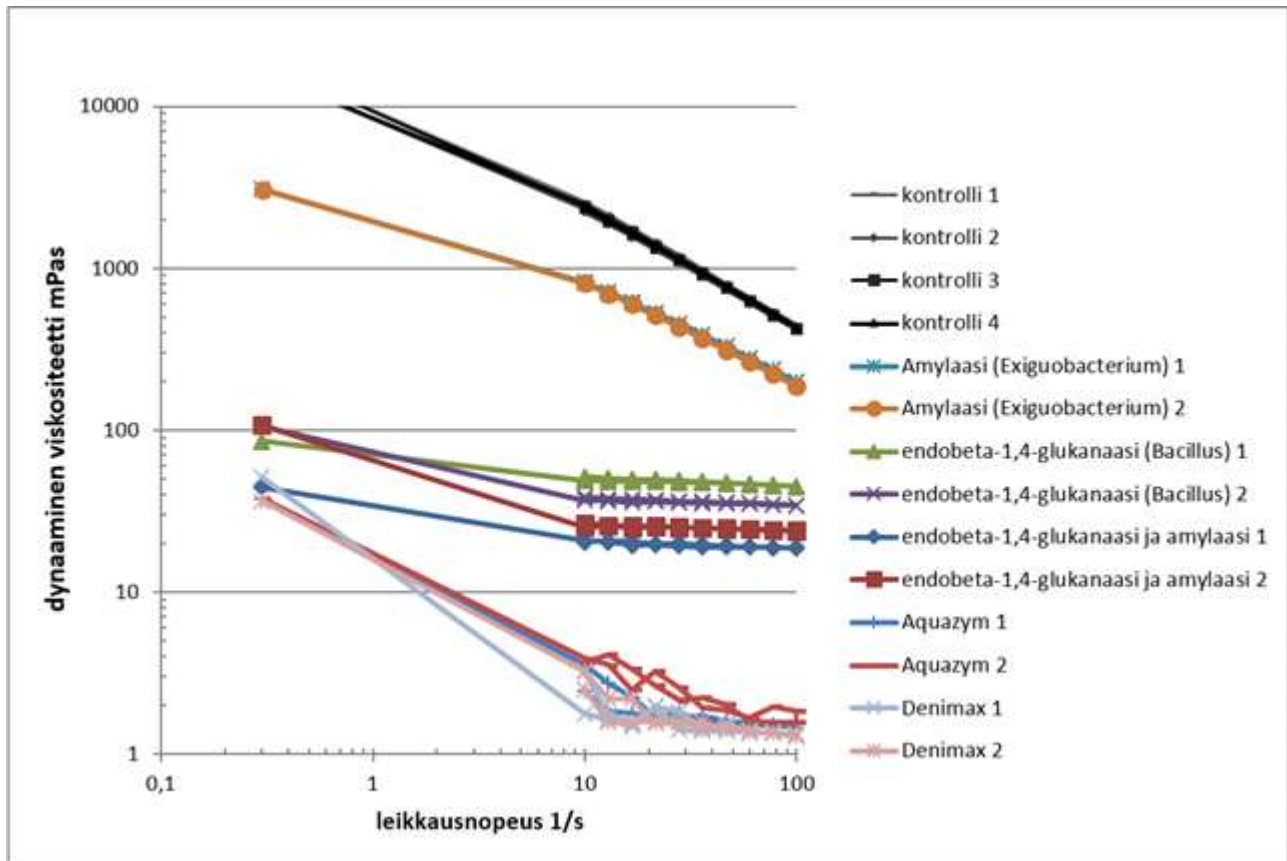
Kuva 21 Teollisuusentsyymipreparaattien a) karboksimeetyliselluloosa- (CMC) ja b) ksylaanitrymogrammit kaksoisvärjättyinä ensin kongopunalla ja sitten Coomassie blue:lla. Kaistat. 1: tyhjä, 2: Aquazym 3 µg, 3: Aquazym 30 µg, 4: Denimax 1,5 µg, 5: Denimax 15 µg, 6: PageRuler mol. paino std., 7 ja 8: ABM5119 DEAE fraktioista yhdistetty prep. 0,1 µg (7) ja 1 µg (8), 9: Lysing enzyme 1,5 µg, 10: Lysing enzyme 15 µg



Kuva 22 Teollisuusentsyymipreparaattien ja ABM5119 puhdistuksen  $\alpha$ -amylaasiaktiivisten preparaattien Red starch  $\alpha$ -amylaasitsymogrammi. Oikealla geeli ennen Coomassie Blue värjäystä, jolloin hydrolyysijuovat näkyvät vaaleina punaista taustaa vasten. Vasemmalla geeli värjätty Coomassie Blue:lla, jolloin hydrolyysibandit näkyvät vaaleina ja proteiinibandit tummanvioletteina. Kaistat, 1: PageRuler molekyyliapinostandardit, 2: ABM5119 Ammoniumsulfaattisaostuksen 40-60% fraktio (pesty), 3: ABM5119 DEAE yhdistetty prep., 4: ABM5119 konsentroidu kasvatuliemen supernatantantti, 5: Denimax 10  $\mu$ g, 6: Lysing enzyme 10  $\mu$ g, 7: Aquazym 30  $\mu$ g, 8: Bio Luvil pesuaine (käsittelemätön)

$\alpha$ -amylaasi alentaa kaurakuituvellin viskositeettia eniten, endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi myös, mutta proteaasi ei ollenkaan

Kun  $\alpha$ -amylaasi oli puhdistettu *Exiguobacterium sp.* RB3:sta, ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi *Bacillus sp.* ABM5119:stä, ja muiden entsyymipreparaattien aktiivisuudet selvitetty, tehtiin niillä kokeet joissa SOF-kaurakuidusta (3,5% w/v) keitettyä viskoosia velliä inkuboitii entsyymien kanssa tai ilman (kontrollit), kylmäsäilytettiin (1. ja 2. kokeet), ja sen jälkeen mitattiin viskositeetit. Entsyymi-inkubaation pituutta ja siinä käytettyä lämpötilaa vaihdeltiin sopivien olosuhteiden selvittämiseksi. Ensimmäisen kaurakuidun entsyymihydrolyysikokeen viskositeettitulokset nähdään kuvassa 23. Siinä oli inkuboitu 37 °C lämpötilassa 9 h, ja sitten 16 d 4 °C. Kuvassa 23 neljän käsittelemättömän kontrollikuituvellin viskositeetin käyrät ovat laskevat, ja lähes samat. Näiden viskositeetti oli  $2439 \pm 114$  mPas leikkausnopeudella 10 1/s (m/s/m)(taulukko 5). Niitä alempana kulkee kahden puhdistetulla  $\alpha$ -amylaasilla käsitellyn kuituvellin käyrät, jotka nekin ovat laskevat.  $\alpha$ -amylaasilla käsiteltyjen viskositeetti on siis seuraavaksi korkein eli  $812 \pm 114$  mPas leikkausnopeudella 10 1/s, ja viskositeetti oli laskenut 67 %, kuten taulukosta 5 nähdään. P-arvo  $\alpha$ -amylaasikäsiteltyjen ja käsittelemättömän kontrollin väliltä löytyi taulukosta 6 ja oli 0,0008. P-arvojen merkitys on käsitelty tulosten tarkastelussa.



Kuva 23 Ensimmäisen SOF-kaurakuidun entsyymihydrolyysikokeen (n=2) viskositeettitulokset tuplalogaritmoidussa käyrästössä

Taulukko 5 Ensimmäisen kaurakuidun entsyymihydrolyysikokeen viskositeetit 10 1/s leikkausnopeudella

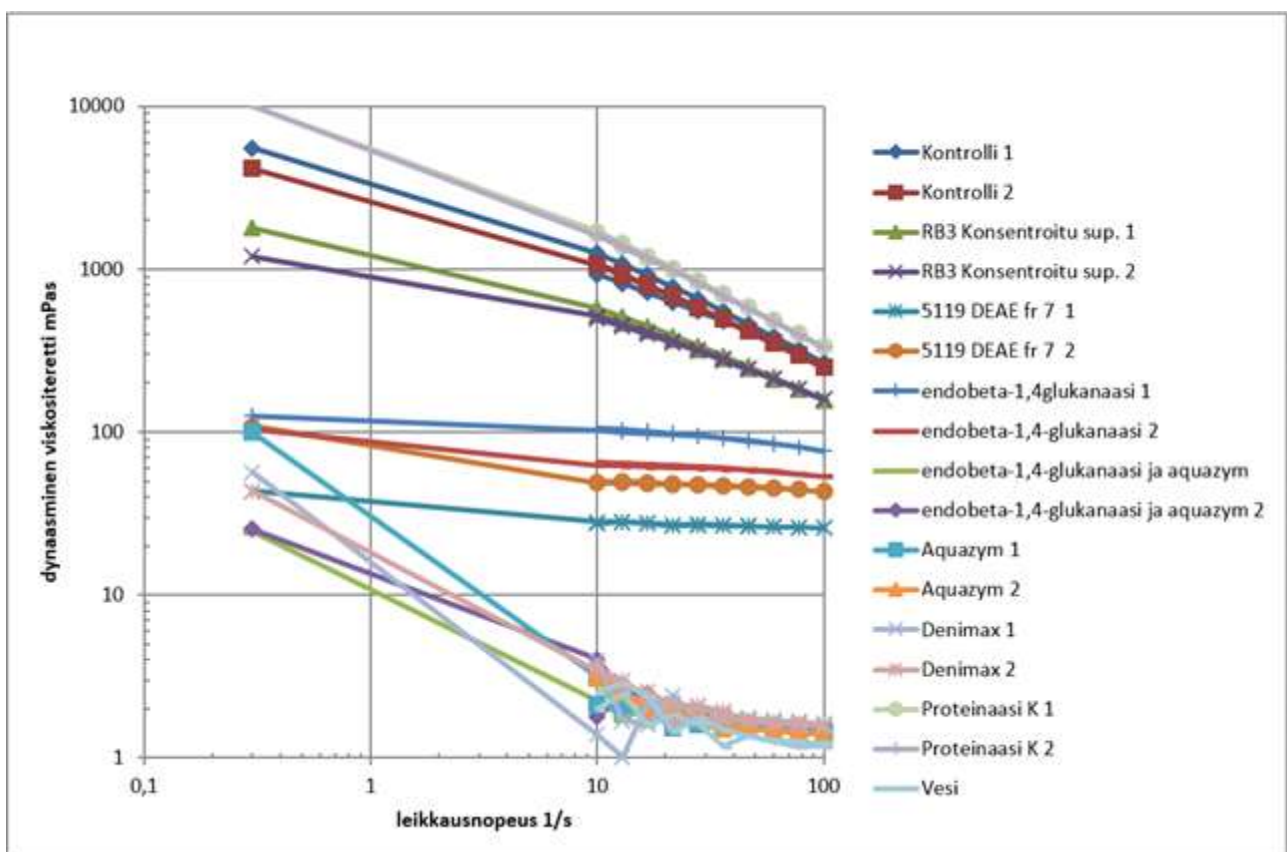
Käsittely	n	viskositeetti mPas				prosenttia kontrollien keskiarvosta	viskositeetin alenema
		keskiarvo	keskihajonta	95% luottamusväli	variaatio-kerroin		
Käsittämätön kontrolli	4	2439	114	223	0,047	100 %	0 %
$\alpha$ -amylaasi	2	812	7	14	0,009	33 %	67 %
endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi	2	43	8	16	0,196	1,8 %	98,2 %
$\alpha$ -amylaasi ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi	2	23	3	6	0,141	0,9 %	99,1 %
Aquazym	2	4	0	1	0,070	0,2 %	99,8 %
Denimax	2	3	1	2	0,420	0,1 %	99,9 %

Kuvassa 23 endo- $\beta$ -1,4-glukanaasilla käsiteltyjen vellien käyrät ovat hieman erisuuret, ja ne ovat leikkausnopeusalueella 10-100 1/s melko vaakasuorat. Taulukosta 5 nähdään, että niiden keskiarvo 10 1/s leikkausnopeudella oli 43 mPas ja viskositeetti oli laskenut 1,8 %:iin käsittelemättömien kontrollien keskiarvosta, eli alenema oli 98,2%.  $\alpha$ -amylaasilla ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasilla käsiteltyjen preparaattien viskositeetit ovat leikkausnopeusalueella 10 – 100 1/s noin 20 – 30 mPas, eli matalammat kuin pelkällä endo- $\beta$ -1,4-glukanaasilla käsiteltyjen tai pelkällä  $\alpha$ -amylaasilla käsiteltyjen. Keskiarvo

näissä oli 23 mPas, ja alenema kontrolliin verrattuna 99,1% (taulukko 5). Yhdessäkin endo- $\beta$ -1,4-glukanaasilla käsitellyistä viskositeetti ei juuri muutu leikkausnopeuden funktiona. Aquazymillä ja Denimaxilla käsiteltyjen preparaattien viskositeetit ovat yli 10 1/s leikkausnopeuksilla alle 4 mPas, mutta leikkausnopeudella 0,3 noin 30-60 mPas.

Taulukko 6 Ensimmäisen kokeen 10 1/s leikkausnopeuden viskositeettitulosten p-arvot valittujen tapausten välillä

Käsittely	kontrolli	endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi	Aquazym
Käsittelmätön kontrolli	1,00000	0,00002	0,00003
$\alpha$ -amylaasi	0,00008	0,00013	0,00385
endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi	0,00002	1,00000	0,09584
$\alpha$ -amylaasi ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi	0,00003	0,15067	0,07386
Aquazym	0,00003	0,09584	1,00000
Denimax	0,00003	0,08906	0,33945



Kuva 24 Toisen kaurakuituvellin entsyymihydrolyysikokeen (n=2) viskositeettitulokset

Toisen kaurakuidun entsyymihydrolyysikokeen inkubaatio entsyymien kanssa 28 °C lämpötilassa kesti 23 h, jonka jälkeen säilytettiin 12 d 4 °C lämpötilassa, ja sen viskositeettitulokset nähdään kuvassa 24. Kuvan 24 mukaan kontrollien viskositeettikäyrät ovat laskevat, ja viskositeetit ovat matalammat kuin kokeessa yksi (kuva 23). Kaikkien käsittelyjen

viskositeetit leikkausnopeudella 10 1/s on lueteltu taulukossa 7, ja kontrollien viskositeetti oli 1157±143 mPas, mikä on noin puolet ensimmäisen kokeen kontrollien viskositeeteista (taulukko 5). *Exiguobacterium sp.* RB3 kannan konsentroidu ja puskurilla pesty supernatantti sisältää sekä proteaasia että  $\alpha$ -amylaasia. Kuvassa 24 sillä käsitellyn kaurakuitupreparaatin viskositeetikäyrä on laskeva. Tällä yritettiin selvittää sitä minkä verran *Exiguobacterium sp.* RB3 erittämät entsyymit alentaisivat viskositeettia kaurakuidun mikrobifermentaatioissa, ja mikä on  $\alpha$ -amylaasin ja proteaasin yhteisvaikutus, ja tästä lisää tulosten tarkastelussa. Supernatantilla viskositeetti aleni 53 % kuten taulukosta 7 nähdään. Proteinaasi K preparaatilla käsitellyn viskositeetit ovat jonkin verran kontrolleja suuremmat, ja käyrät ovat laskevat. Niiden viskositeetti 10 1/s leikkausnopeudella on 1657±62 mPas (taulukko 7), ja p-arvo kontrolliin on 0,088 (taulukko 8).

Kuvan 24 endo- $\beta$ -1,4-glukanaasilla käsiteltyjen käyrät laskevat melko loivasti ja ensimmäisessä niistä viskositeetti on välillä 80 – 110 mPas, ja toisessa noin 60 - 70 mPas. Taulukossa 7 näiden viskositeetti on 82,2±27,6 mPas, ja alenema verrattuna käsittelemättömään kontrolliin 93 %. *Bacillus sp.* ABM5119 puhdistuksen DEAE fraktiolla 7, joka sisältää endo- $\beta$ -1,4-glukanaasia ja proteaasia, käsitellyn kuituvellin viskositeetikäyrät nähdään puhtaan endo- $\beta$ -1,4-glukanaasin käyrien alapuolella kuvassa 24. Kuten ensimmäisessä kokeessa (kuva 23), ovat kuvassa 24 Aquazymillä ja Denimaxilla käsiteltyjen viskositeetit alle 4 mPas yli 10 1/s leikkausnopeuksilla, ja 0,3 1/s leikkausnopeudella muutamia kymmeniä mPas kuten myös endo- $\beta$ -1,4-glukanaasilla käsitellyissä. Taulukkoon 7 on koottu toisessa kokeessa eri tavalla käsiteltyjen kaurakuitupreparaattien viskositeettitulokset leikkausnopeudella 10 1/s, ja taulukkoon 8 on laskettu p-arvot vertailun kannalta kiinnostavien väliltä. Näistä enemmän tulosten tarkastelussa.

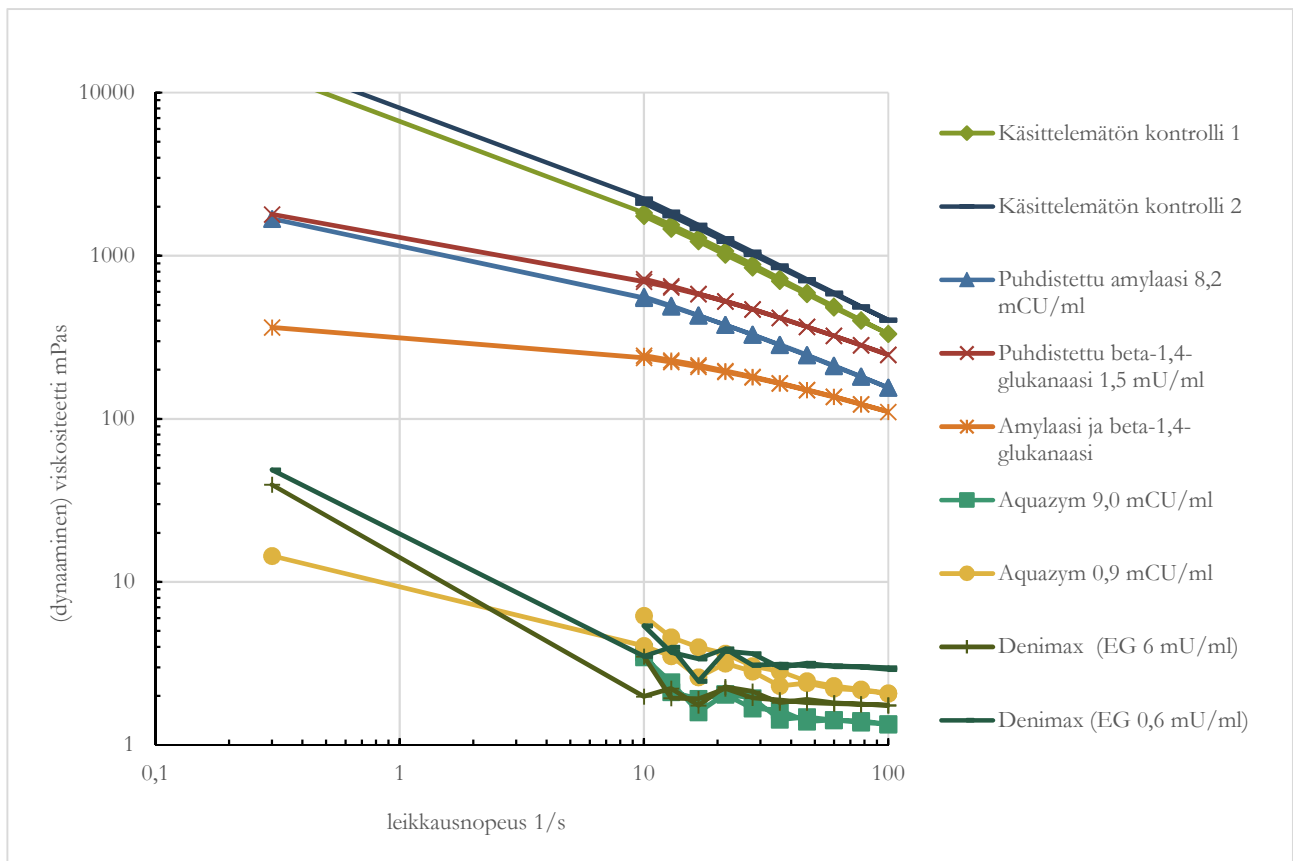
**Taulukko 7 Toisen kaurakuituvellin entsyymihydrolyysikokeen viskositeetit leikkausnopeudella 10 1/s**

Käsittely	viskositeetti mPas leikkausnopeudella 10 1/s			varaatio-kerroin	prosenttia kontrollista	
	keskiarvo	keskihajonta	95% luottamusväli		keskiarvo	alenema
Käsittelemätön kontrolli	1158	143,5	281,3	12,4 %	100 %	0 %
RB3 kannan supernatantti	545	47,1	92,3	8,6 %	47 %	53 %
ABM5119 DEAE-fraktio 7 (endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi ja proteaasi)	38,4	14,6	28,6	38,0 %	3,3 %	97 %
endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi	82,2	27,6	54,1	33,5 %	7,1 %	93 %
endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi + Aquazym	3,1	1,3	2,5	40,5 %	0,3 %	100 %
Aquazym ( $\alpha$ -amylaasi, ksylanaasi, proteaasi)	3,3	0,2	0,4	6,1 %	0,3 %	100 %
Denimax (ksylanaasi, endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi, proteaasi)	2,4	1,4	2,8	59,8 %	0,2 %	100 %
Proteinaasi K	1657	62,2	122,0	3,8 %	143 %	-43 %
Vesi	2,0	-	-	-	0,2 %	100 %



Taulukko 8 Toisen kokeen 10 1/s leikkausnopeuden viskositeettitulosten p-arvot valittujen tapausten välillä

Käsittely	käsittelemätön kontrolli	endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi	Aquazym
Käsittelemätön kontrolli	1,000	0,052	0,056
RB3 supernatantti	0,080	0,014	0,039
ABM5119 DEAE-fraktio 7	0,055	0,224	0,182
endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi	0,052	1,000	0,154
endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi ja Aquazym	0,056	0,153	0,873
Aquazym	0,056	0,154	1,000
Denimax	0,056	0,152	0,539
Proteinaasi K	0,088	0,006	0,017



Kuva 25 Kolmannen kaurakuituvellien entsyymihydrolyysikokeen (n=1) viskositeettitulokset

Kolmannen kaurakuidun entsyymihydrolyysikokeen inkubaatio 28 °C lämpötilassa kesti 9 h, ja viskositeetit (kuva 25) mitattiin heti sen jälkeen. Taulukossa 9 on tämän kokeen viskositeetit leikkausnopeudella 10 1/s. Kuten kuvasta 25 nähdään, kontrollien viskositeettikäyrät ovat laskevat ja taas melko samat, ja niiden viskositeetit ovat suurimmat. Taulukon 9 kontrollien keskiarvo on 2036 mPas. Kuvan 25 käyristä ja taulukon yhdeksän 10 1/s leikkausnopeuden

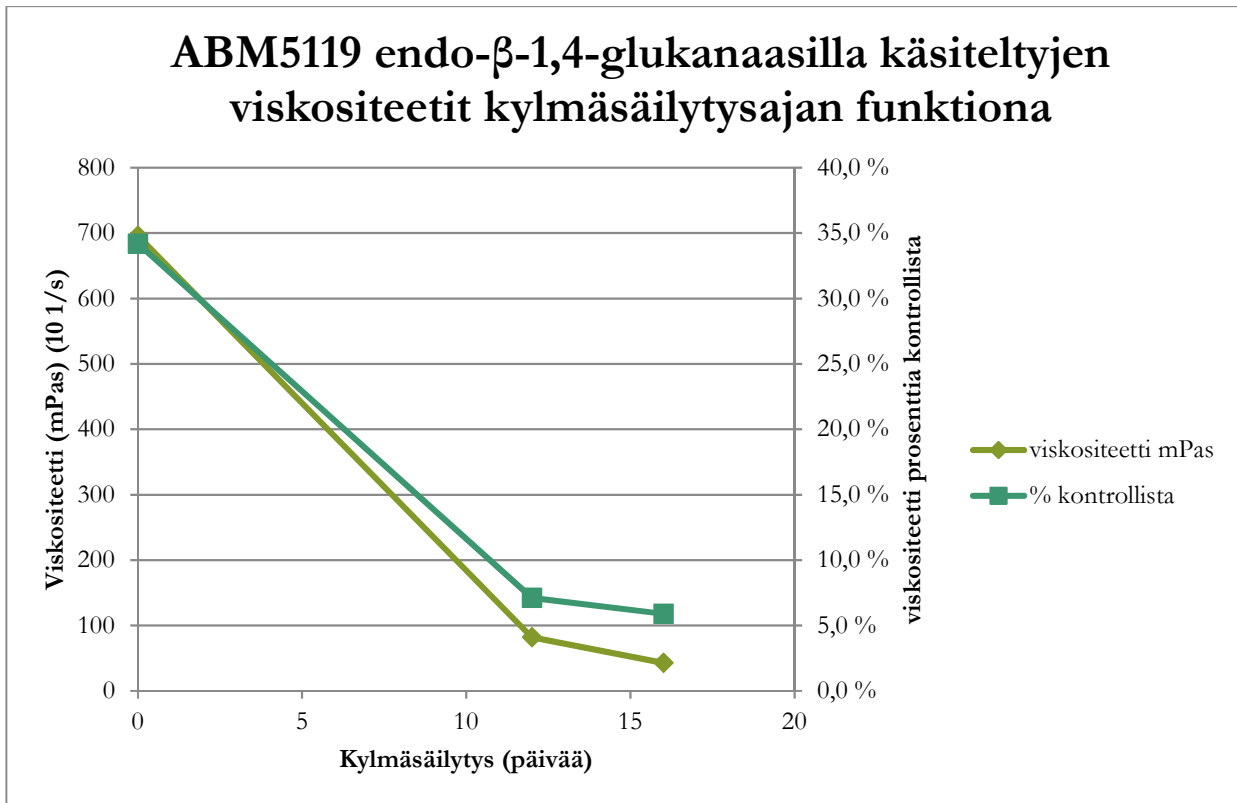
arvoista nähdään, että seuraavaksi korkein viskositeetti on endo- $\beta$ -1,4-glukanaasilla käsitellyssä, eikä  $\alpha$ -amylaasilla käsitellyssä, toisin kuin kahdessa ensimmäisessä kokeessa. Kuvasta 25 ja taulukosta 9 nähdään, että  $\alpha$ -amylaasilla ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasilla käsitellyn viskositeetti on alempi kuin  $\alpha$ -amylaasilla tai endo- $\beta$ -1,4-glukanaasilla yksinään käsiteltyjen viskositeetit. Aquazymillä ja Denimaxilla käsiteltyjen viskositeetit ovat tässäkin alle 4 mPas yli 10 l/s leikkausnopeuksilla. 0,3 l/s leikkausnopeudella viskositeetit ovat tätä suuremmat, kuten kuvasta 25 näkee.

Taulukossa 9 on esitetty kolmannen kokeen viskositeetit leikkausnopeudella 10 l/s. Koska viskositeetit ovat kuvien 23, 24 ja 25 käyrästöissä esitetty logaritmoituina, on taulukossa 9 esitetty viskositeetit myös logaritmoituina, sekä laskettu näistä osuus kontrollin logaritmoidusta viskositeetista prosentteina. Koska kolmas koe tehtiin vain yhdellä reaktiolla testitapausta kohti ei p-arvoja tai muita tilastollisia tunnuslukuja voi sen tuloksista laskea.  $\alpha$ -amylaasin aiheuttama viskositeetin alenema verrattuna kontrollien keskiarvoon on 73 %, ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasin 66 %.

**Taulukko 9** Kolmannen kaurakuituvellin entsyymihydrolyysikokeen viskositeetit leikkausnopeudella 10 l/s

Käsittely	viskositeetti		viskositeetin logaritmi	logaritmi % kontrolleista
	mPas	prosenttia kontrolleista		
Käsitlemätön kontrolli 1	1836	90 %	3,3	99 %
Käsitlemätön kontrolli 2	2235	110 %	3,3	101 %
$\alpha$ -amylaasi	553	27 %	2,7	83 %
endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi	696	34 %	2,8	86 %
$\alpha$ -amylaasi ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi	237	12 %	2,4	72 %
Aquazym (9 mCU/ml $\alpha$ -amylaasia)	3,5	0,2 %	0,54	16 %
Aquazym (0,9 mCU/ml $\alpha$ -amylaasia)	4,0	0,2 %	0,61	18 %
Denimax (6 mU/ml endo- $\beta$ -1,4-glukanaasia)	2,0	0,1 %	0,30	9 %
Denimax (0,6 mU/ml endo- $\beta$ -1,4-glukanaasia)	3,5	0,2 %	0,54	16 %

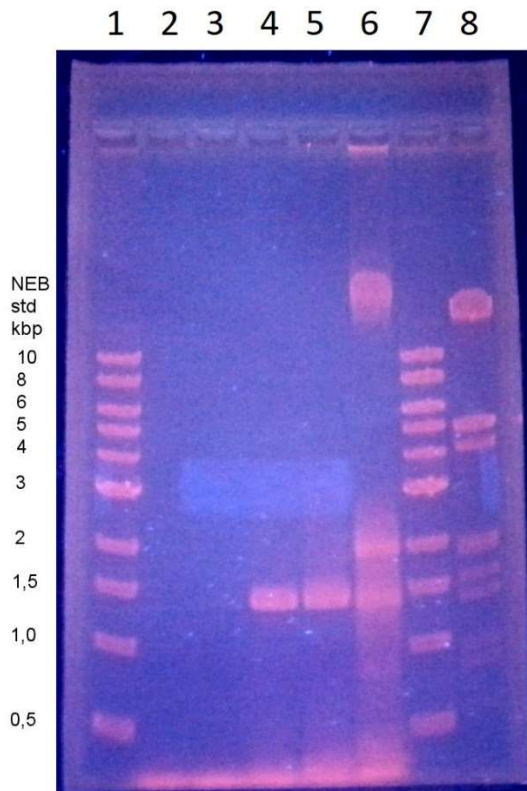
Kolmannessa kokeessa viskositeetit mitattiin heti entsyymikäsitelyn jälkeen, toisessa 12 d kylmäsäilytyksen jälkeen, ja ensimmäisessä 16 d kylmäsäilytyksen jälkeen. Kuvan 26 graafissa on esitetty puhdistetun endo- $\beta$ -1,4-glukanaasin aiheuttamat viskositeetin alenemat kylmäsäilytysajan keston mukaan. Nähdään, että viskositeetti ja se suhteessa käsittelemättömän kontrollin viskositeettiin laskevat kylmäsäilytyksen aikana.



Kuva 26 endo- $\beta$ -1,4-glukanaasin aiheuttamat viskositeetin alenmat kylmäsäilytysajan keston mukaan

*Exiguobacterium sp.* RB3 kannan  $\alpha$ -amylaasigeenin PCR-monistus, kloonaukset ja sekvensointi onnistuivat

Materiaaleissa ja menetelmissä kuvatulla tavalla suunniteltiin PCR-alkueet *Exiguobacterium sp.* RB3  $\alpha$ -amylaasigeenin proteiinia koodaavan osan monistamiseksi sen bakteerikannan DNA:sta. PCR tehtiin usealla eri anneaing-lämpötilalla koska alkueiden toiminta ei ollut täysin varmaa. PCR-monistuksen reaktiot analysoitiin agarosegeelillä, joka nähdään kuvassa 27. Nelikulmainen sinertävä alue kuvan keskellä kaistojen 3-5 kohdalla on heijastuma. Kaistoilla neljä ja viisi nähdään noin 1,5 kb kokoinen PCR-tuote. Kaistalla neljä 58,2 °C anneaing-lämpötilan reaktiossa tämän lisäksi ei ollut syntynyt juurikaan epäspesifisiä tuotteita. Tämä PCR tuote puhdistettiin ja kloonattiin pUC19-vektoriin materiaaleissa ja menetelmissä kuvatulla tavalla, ja sitten sekvensoitiin. RB3 kannan  $\alpha$ -amylaasia koodaava nukleotidisekvenssi on esitetty liitteessä kaksi.



Kuva 27 *Exiguobacterium* RB3 kannan  $\alpha$ -amylaasigeenin (koodaavan sekvenssin erittyvän osan) PCR tuotteiden agarosigeelielektroforeesi. Ta on PCR:ssä käytetty annealing lämpötila. Kaistat: 1 ja 7: DNA pituusstandardit (New England Biolabs 1 kb ladder), 2: PCR Ta=72 °C, 3: PCR Ta=67,5 °C, 4: PCR Ta=58,2 °C, 5: PCR Ta=50 °C, 6: *Exiguobacterium* sp. RB3 kannasta eristetty DNA (ei RNAasi käsitelty), 8: DNA pituusstandardi lambda DNA *EcoRI* ja *HindIII* digestoitu (Fermentas)

$\alpha$ -amylaasin aminohapposekvenssi on erilainen kuin aiemmin karakterisoiduilla *Exiguobacterium* amylaaseilla

Nukleotidisekvenssistä transloitiin  $\alpha$ -amylaasin aminohapposekvenssi. Siitä expasy pI/MW:llä laskettu proteiinin molekyylipaino on 54362 Da ja pI on 5,65.

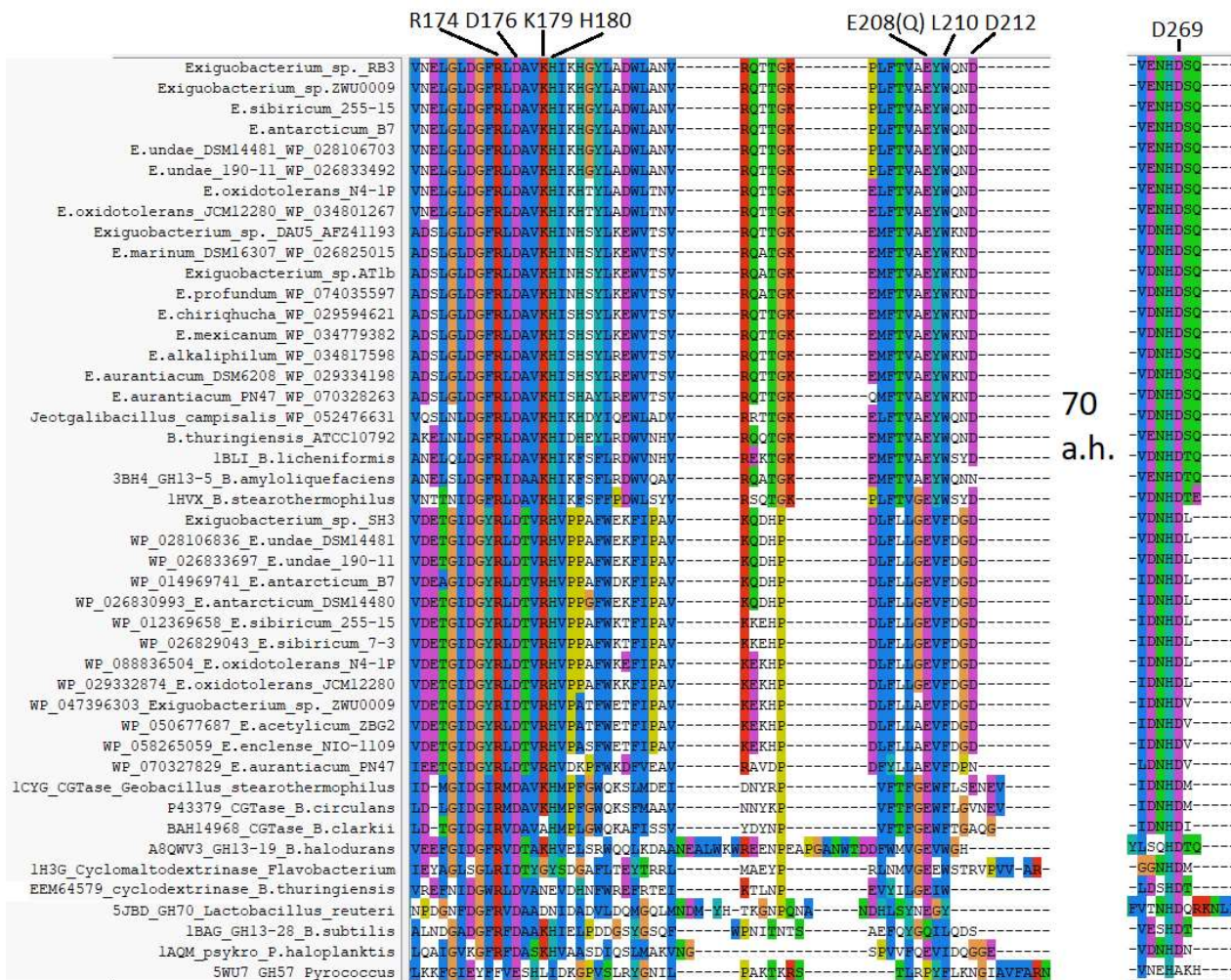
TBlastn:llä löydettiin RB3 kannan  $\alpha$ -amylaasin aminohapposekvenssille homologisia sekvenssejä joista ensimmäiset tulokossa 10. Taulukossa 10 esitettyjen osumien jälkeen oli osumia eri *Bacillus*- $\alpha$ -amylaasien sekvensseihin ja niiden kaikkien identtisyyksi oli 75%. Koska niistä ei selviä mitään mielenkiintoista on ne jätetty taulukosta 10 pois. Nähdään että taulukon 10 osumissa samanlaisuus (identity) on kuudessa ensimmäisessä >90%, jonka jälkeen seuraavilla se on noin 76%. Ensimmäinen osuma *Exiguobacterium* sp. ZWU0009 on suolistobakteeri. *E. sibiricum* 255-15 kannan  $\alpha$ -amylaasi on 97% identtinen, ja *E. antarcticum* B7 kannan 96% identtinen RB3  $\alpha$ -amylaasin kanssa. Näitä ei ole biokemiallisesti karakterisoitu vaan sekvenssit ovat peräisin genomiprojekteista. Chang ym. 2013 karakterisoiman *Exiguobacterium* sp. DAU5  $\alpha$ -amylaasin aminohapposekvenssi esiintyy listassa seitsemäntenä, ja on 76% identtinen. Huomataan myös, että Enampour ym. (2015) karakterisoima *Exiguobacterium* sp. SH3  $\alpha$ -amylaasi ei ole Taulukon 10 osumissa, eikä se myöskään esiintynyt niissä osumissa jotka tästä on jätetty pois.

Taulukko 10 RB3 kannan  $\alpha$ -amylaasin aminohapposekvenssin BLAST tulosten 17 ensimmäistä osumaa

		Sequences producing significant alignments:					
Select for downloading or viewing reports	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query cover</u>	<u>E value</u>	<u>Ident</u>	<u>Accession</u>
<input type="checkbox"/>	Select seq CP018057.1 <a href="#">Exiguobacterium sp. ZWU0009 complete genome</a>	987	1758	99%	0.0	99%	<a href="#">CP018057.1</a>
<input type="checkbox"/>	Select seq CP015731.1 <a href="#">Exiguobacterium sp. U13-1, complete genome</a>	987	1757	99%	0.0	99%	<a href="#">CP015731.1</a>
<input type="checkbox"/>	Select seq CP006866.1 <a href="#">Exiguobacterium sp. MH3, complete genome</a>	986	1627	99%	0.0	99%	<a href="#">CP006866.1</a>
<input type="checkbox"/>	Select seq CP001022.1 <a href="#">Exiguobacterium sibiricum 255-15, complete genome</a>	967	1833	99%	0.0	97%	<a href="#">CP001022.1</a>
<input type="checkbox"/>	Select seq CP003063.1 <a href="#">Exiguobacterium antarcticum B7, complete genome</a>	961	1764	99%	0.0	96%	<a href="#">CP003063.1</a>
<input type="checkbox"/>	Select seq CP022236.1 <a href="#">Exiguobacterium oxidotolerans strain N4-1P genome</a>	942	1544	99%	0.0	93%	<a href="#">CP022236.1</a>
<input type="checkbox"/>	Select seq JQ706070.1 <a href="#">Exiguobacterium sp. DAU5 alpha-amylase gene, complete cds</a>	788	788	99%	0.0	76%	<a href="#">JQ706070.1</a>
<input type="checkbox"/>	Select seq CP001615.1 <a href="#">Exiguobacterium sp. AT1b, complete genome</a>	788	1480	99%	0.0	76%	<a href="#">CP001615.1</a>
<input type="checkbox"/>	Select seq CP003687.1 <a href="#">Bacillus thuringiensis MC28, complete genome</a>	767	879	99%	0.0	77%	<a href="#">CP003687.1</a>
<input type="checkbox"/>	Select seq CP020937.1 <a href="#">Bacillus cereus strain BC-AK genomic sequence</a>	766	875	99%	0.0	76%	<a href="#">CP020937.1</a>
<input type="checkbox"/>	Select seq CP015589.1 <a href="#">Bacillus cereus strain AR156, complete genome</a>	766	875	99%	0.0	76%	<a href="#">CP015589.1</a>
<input type="checkbox"/>	Select seq CP009641.1 <a href="#">Bacillus cereus 03BB108, complete genome</a>	766	876	99%	0.0	76%	<a href="#">CP009641.1</a>
<input type="checkbox"/>	Select seq CP009590.1 <a href="#">Bacillus cereus G9241, complete genome</a>	766	875	99%	0.0	76%	<a href="#">CP009590.1</a>
<input type="checkbox"/>	Select seq CP009369.1 <a href="#">Bacillus cereus strain FM1, complete genome</a>	766	875	99%	0.0	76%	<a href="#">CP009369.1</a>
<input type="checkbox"/>	Select seq CP009941.1 <a href="#">Bacillus cereus strain 03BB87, complete genome</a>	766	875	99%	0.0	76%	<a href="#">CP009941.1</a>
<input type="checkbox"/>	Select seq CP013000.1 <a href="#">Bacillus thuringiensis strain XL6, complete genome</a>	766	874	99%	0.0	76%	<a href="#">CP013000.1</a>
<input type="checkbox"/>	Select seq CP026375.1 <a href="#">Bacillus cereus ATCC 10987 chromosome</a>	764	873	99%	0.0	76%	<a href="#">CP026375.1</a>

*Exiguobacterium* ja muiden  $\alpha$ -amylaasien aminohapposekvenssien linjaus tuo esiin katalyyttiset ja kalsiumeja sitovat aminohapot

Materiaaleissa ja metodeissa kuvatulla tavalla valituista sekvensseistä saatiin linjaus *Exiguobacterium*-amylaaseille. Huomautettakoon, että jostain lajeista kuten *E. sibiricumista* löytyi hauissa kaksi  $\alpha$ -amylaasiproteiinia, yksi RB3 tai DAU5  $\alpha$ -amylaasilla hakemalla, ja toinen SH3  $\alpha$ -amylaasilla hakemalla. Tätä on käsitelty tulosten tarkastelussa.  $\alpha$ -amylaasien aminohapposekvensseistä tehtiin linjaus mm. sen takia, että sen avulla rakennetutkimuksien perusteella tietyn funktion omaavat aminohapot voidaan löytää muistakin amylaaseista, kuten RB3  $\alpha$ -amylaasissa, eli voidaan määrittää esim. sen nukleofiili, happo-emäs katalyytti, ja kalsiumia sitovat aminohapot. Kuvassa 28 nähdään  $\alpha$ -amylaasien aminohapposekvenssien linjauksesta ne kohdat joissa katalyyttiset aminohapot sijaitsevat, ja kuvassa 29  $\alpha$ -amylaasien B-domeenin kohta.

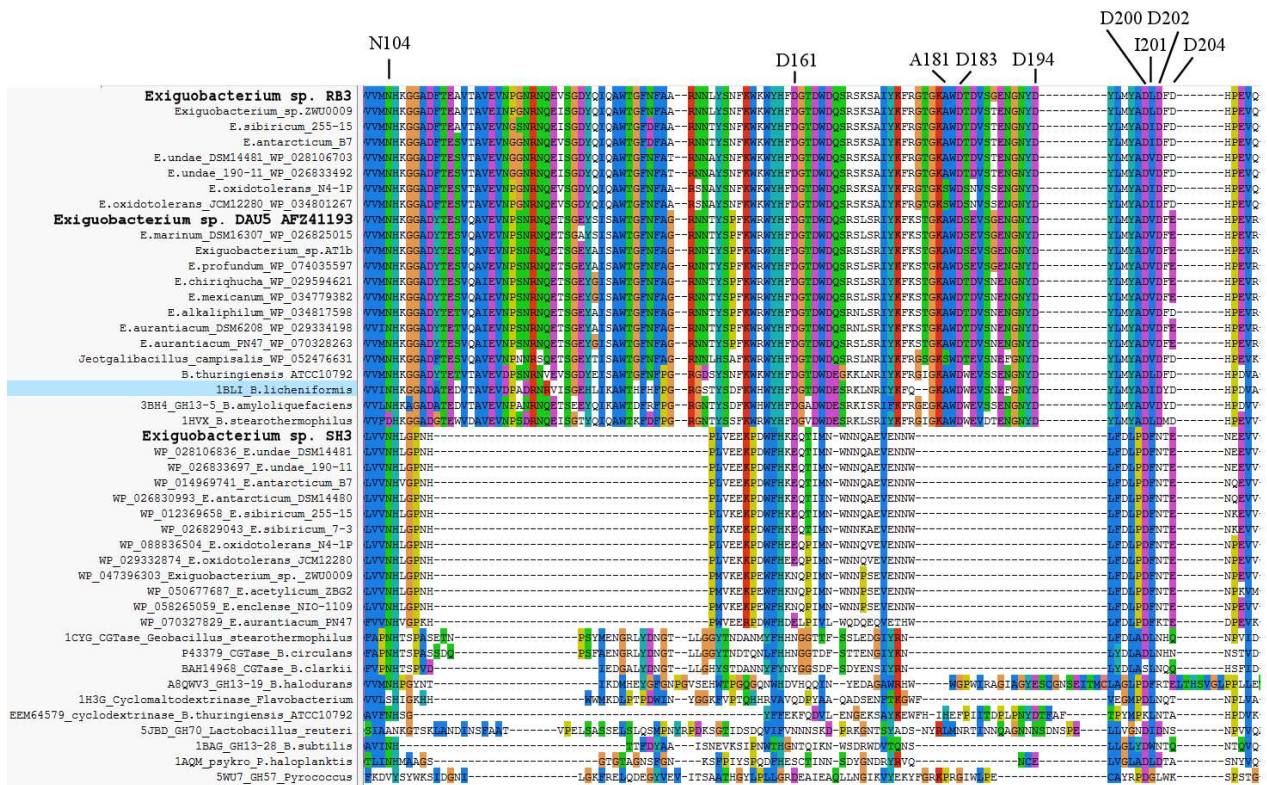


Kuva 28  $\alpha$ -amylaasien linjauksesta katalyyttisten aminohappojen kohdat. Sekvenssit on linjattu MAFFT:lla ja linjaus on visualisoitu ClustalX:ssa. Numeroidut aminohapot joita vastaavat linjauksen kohdat on osoitettu viivoilla viittaavat Fujimoto ym. (1998) *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylaasin rakenteeseen.

Kuvassa 28 ylläpäällä linjauksen päällä on Fujimoto ym. (1998) rakenteen aminohapot ja seuraavassa käytetään sen rakenteen ja sekvenssin numerointia. Fujimoto ym. (1998) mukaan R174, K179, H180, D212 ja D269 sitovat substraattia eli amyloosia vetysidoksin eri kohdista. Kuvan 28 linjauksessa näistä R174 ja D269 ovat täysin konservoituneita amylaaseissa, vain GH57 entsyymissä ne eivät ole. Fujimoto ym. (1998) mukaan Q208 paikalla oleva E toimii happo/emäs katalyyttinä joka luovuttaa protonin glykosidisidoksen hapelle, ja siten katkaisee sidoksen. Tämä glutamaatti on konservoitunut kaikissa  $\alpha$ -amylaaseissa. Fujimoto ym. (1998) mukaan D176 taas toimii ”emäskatalyyttinä” eli nukleofiilina, ja Brzozowski & Davies (1997) mukaan *A. oryzae*  $\alpha$ -amylaasissa vastaava D toimii nukleofiilina. Tällä kohtaa oleva aminohappo on kaikissa sekvensseissä D (paitsi GH57:ssä E joka voisi toteuttaa samaa funktiota). Fujimoto ym. (1998) mukaan H180 sitoo  $Ca^{2+}$ :ia peptidisidoksensa aminoryhmän avulla ja substraattia sivuketjunsä aminoryhmän avulla. Kuten kuvasta 28 nähdään, tämä on konservoitunut kaikissa  $\alpha$ -amylaaseissa ml. *Exiguobacterium*  $\alpha$ -amylaasit. Fujimoto ym. (1998) mukaan L210 sitoo sivuketjullaan substraatin yhtä glukoosia sen alta hydrofobisen vuorovaikutuksen avulla. Kuvasta 28 nähdään, että tätä vastaava aminohappo on *Exiguobacterium sp.* RB3 ja DAU5, sekä

*Bacillus thuringiensis*, *licheniformis*, *amyloliquefaciens* ja *stearothermophilus* amylaaseissa tryptofaani (W), kun taas *Exiguobacterium* sp. SH3 ja kolmessa CGTaaissa tämä on fenyylialaniini (F).

Kuvan 28 linjauksen perusteella siis Fujimoto ym. (1998) *B. subtilis*  $\alpha$ -amylaasin em. aminohappoja vastaavat ovat *Exiguobacterium* sp. RB3  $\alpha$ -amylaasissa R228 (lähes konservoitunut Arg), D230 (nukleofiili), K233, H234 (substraattia sitovia), E260 (happo-emäs katalyytti), W262 (substraattia hydrofobisesti sitova), D265 (substraattia sitova) ja D327 (happo-emäs katalyytin pKa:ta nostava ja substraattia sitova).



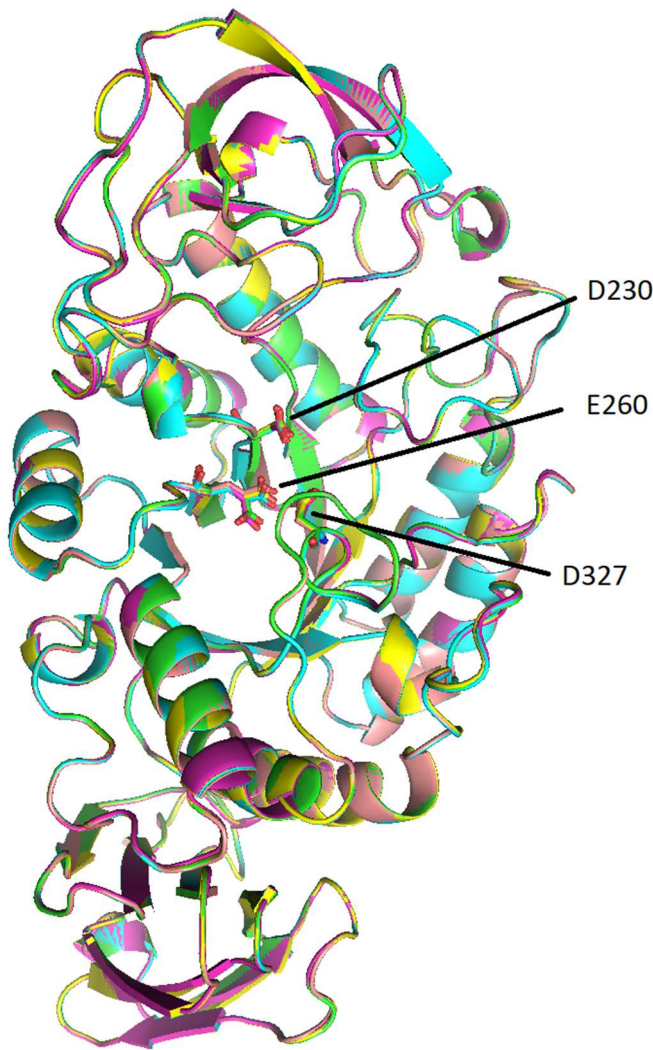
Kuva 29 A-amylaasin linjas B-domeenin kohdalta. *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylaasin kalsiumeja ja natriumia sitovat aminohapot merkitty linjauksen päälle (*B. licheniformis* numerointi)

*B. licheniformis*  $\alpha$ -amylaasissa B-domeeniksi on määritelty aminohapot V102-D202 (Machius ym. 1998). Kuvassa 29 on esitetty  $\alpha$ -amylaasisekvenssien linjauksesta B-domeenin kohta, ja merkitty *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylaasin rakenteessa Machius ym. (1998) mukaan  $\text{Ca}^{2+}$  ja  $\text{Na}^{+}$  sitovat aminohapot. Kuvasta 29 nähdään, että nämä kaikki ovat konservoituneet *Exiguobacterium* sp. RB3 ja DAU5  $\alpha$ -amylaaseissa, ja niiden kaltaisissa sekvensseissä. Kuten kuvasta 29 nähdään, on *Exiguobacterium* sp. SH3  $\alpha$ -amylaasin B-domeenissa kaksi pitkää deleetiota kohdissa joissa useissa muissakin entsyymeissä (mm. CGTaaissa) on deleetiot. Näistä jälkimmäinen on samanpituisen kuin *B. subtilis*  $\alpha$ -amylaasissa. Deleetiot aiheuttavat sen, ettei kaikkia  $\text{Ca}^{2+}$  ja  $\text{Na}^{+}$  sitovia aminohappoja ole SH3  $\alpha$ -amylaasin B-domeenissa.

RB3  $\alpha$ -amylaasin homologimallinnettu rakenne on samanlainen kuin *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylaasilla

Jotta *Exiguobacterium* sp. RB3  $\alpha$ -amylaasin ominaisuuksia voisi arvioida sen rakenteen avulla, tehtiin sen aminohapposekvenssin perusteella siitä homologimallinnuksella (engl. ns. threading) Robetta-serveriä käyttäen malli,

joka on esitetty kuvassa 30. Chang ym. (2013) ja Enampour ym. (2015) karakterisoimille *Exiguobacterium*-amylaaseille tehtiin myös mallit jotta voitiin selvittää onko niiden rakenteissa jotain joka selittäisi biokemiallisia eroja.

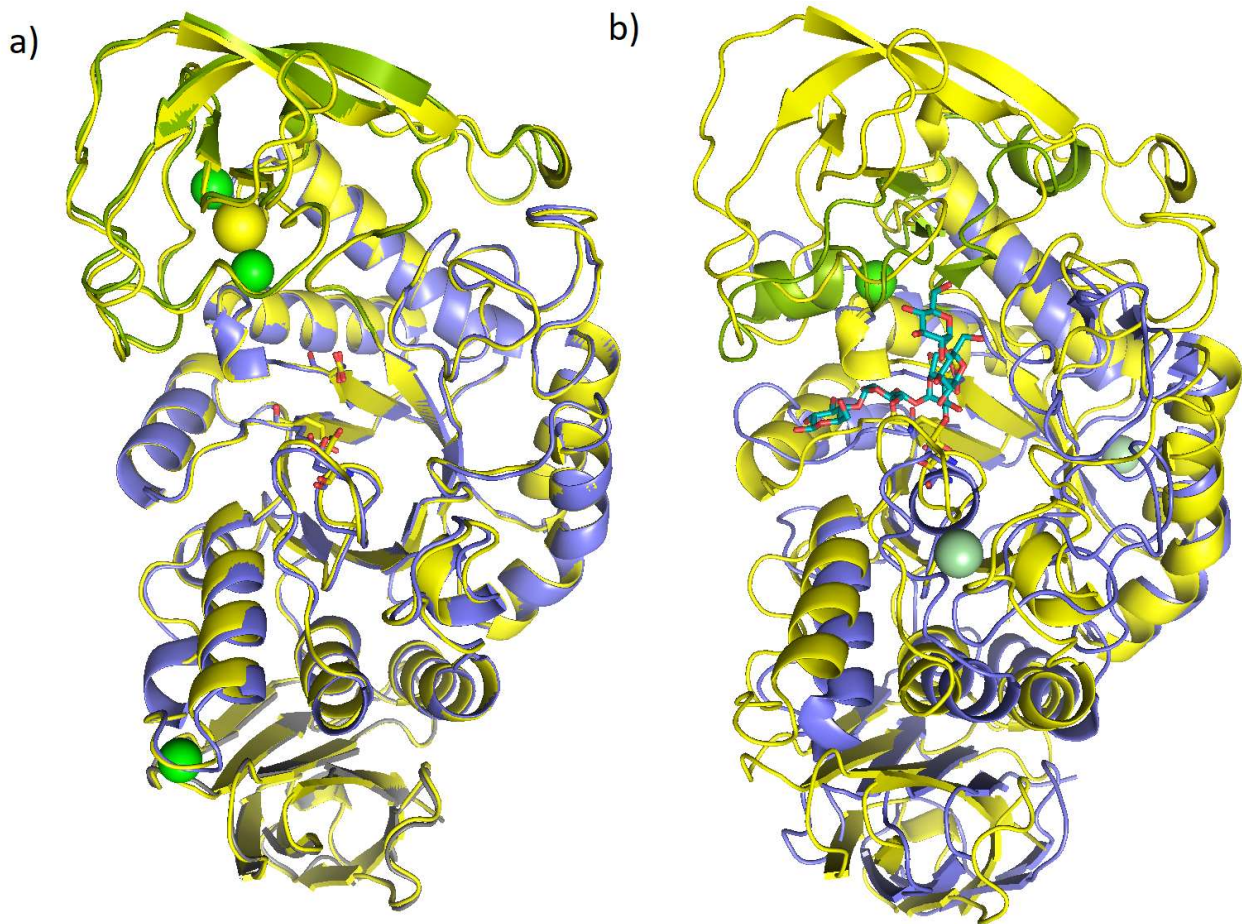


Kuva 30 *Exiguobacterium* sp. RB3  $\alpha$ -amylaasin Robettalla tuotetut viisi rakennemallia cartoon esityksenä asetettuina päällekkäin ja eri väreillä. Kuvan 20 linjauksen avulla päätellyt kolme katalyyttistä aminohappoa D230 (nukleofiili), E260 (happo-emäs) ja D327 (pKa-nostava/substrattia sitova/transitioilaa stabiloiva) on esitetty pallotikkumalleina

Mallinnettaessa Robetta serverillä saadaan viisi eri mallia. Kuvan 30 rakenteesta nähdään, että kaikki viisi *Exiguobacterium* RB3  $\alpha$ -amylaasin mallia ovat proteiinin alfa-hiilien ja peptidisidosten muodostaman selkärangan osalta lähes samat. Eri malleissa esimerkiksi E230 aminotyyppien sijainti vaihtelee alle 0,1 Å, ja sen karbonyylihapin sijainti vaihtelee 0,2 – 0,6 Å. Sivuketjujen osalta on enemmän hajontaa. Kuvassa 30 esim. katalyyttisen D260 sivuketjulla esiintyy malleissa kahta eri konformaatiota. Rakenteesta nähdään, että sen keskellä on kahdeksasta  $\alpha$ -kierteestä, ja beta-levystä muodostuva TIM-tynnyri, jollainen  $\alpha$ -amylaasin domeeni A on. Sen yläpuolella on betalevyjen muodostama rakenne, ja sen alapuolella on kahdeksan betalevyn muodostama rakenne. Nähdään, että katalyyttiset aminohapot ovat TIM-tynnyrin päässä. Koska RB3  $\alpha$ -amylaasin eri mallit ovat hyvin samanlaisia käytetään seuraavissa kuvissa niiden selkeyttämiseksi vain ensimmäistä mallia. Samanlainen tarkastelu tehtiin myös DAU5 ja SH3 malleille, ja niissäkin (saman proteiinin) mallit olivat hyvin

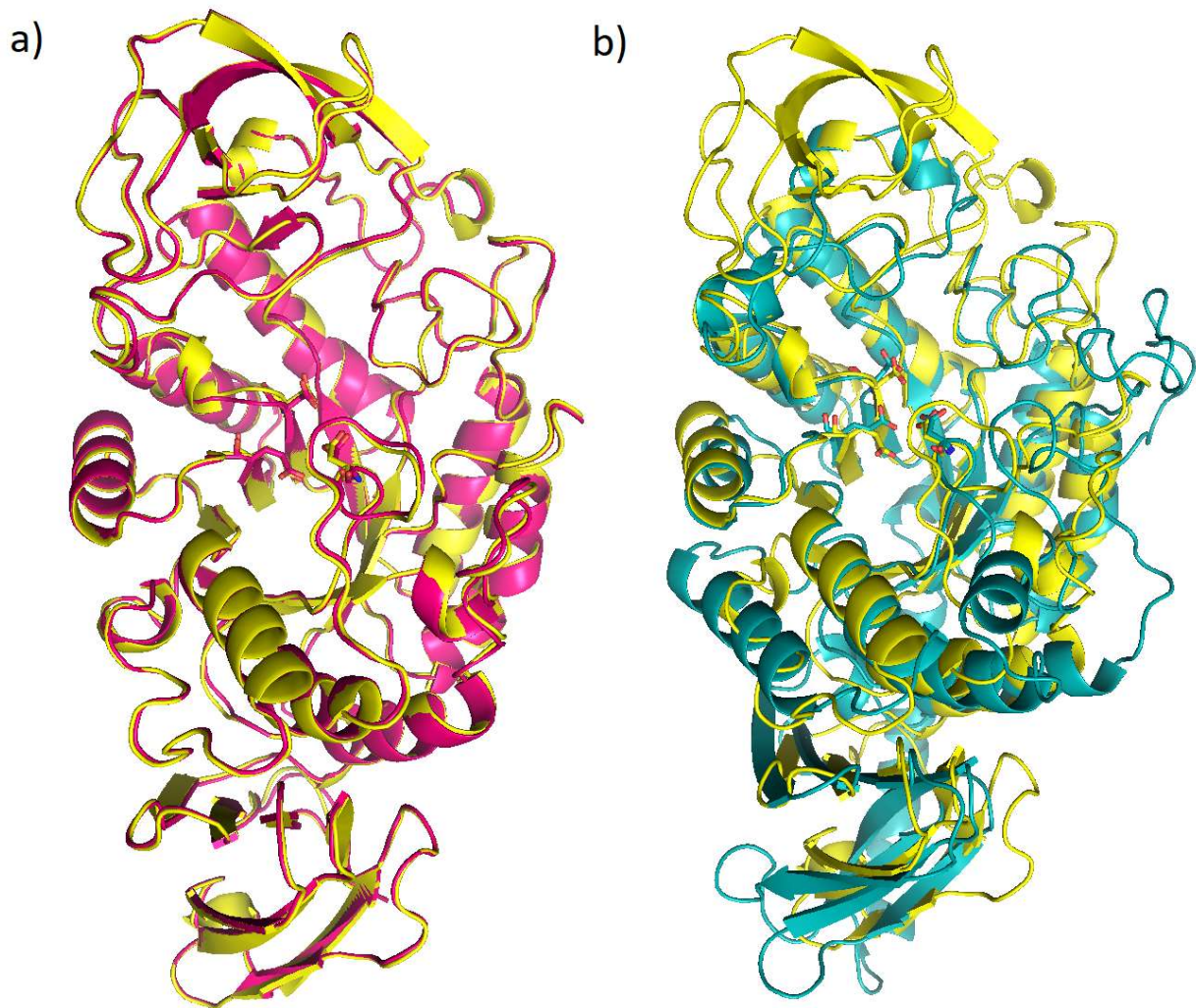


samanlaiset, ja siten niistäkin päädyttiin käyttämään jatkossa vain malleja no 1. RB3  $\alpha$ -amylaasin aminohapposekvenssissä ei ole yhtään kysteiniä, joten siinä ei voi olla disulfididisidoksiakaan.



Kuva 31 RB3  $\alpha$ -amylaasin rakennemallin vertailu a) *B. licheniformis* (PDB id: 1BLI) b) *B. subtilis* (PDB id: 1BAG)  $\alpha$ -amylaasien kiderakenteisiin. RB3  $\alpha$ -amylaasin malli on keltaisella, ja *Bacillus*  $\alpha$ -amylaasit on väritetty kuten kuvissa 7 ja 8, eli A-domeeni sininen, B-domeeni vihreä, ja C-domeeni harmaa. Katalyyttiset aminohapot (triadi) on esitetty tikkumalleina ja b) kuvassa maltopentoosisubstraatti on turkooseina tikkuina (hapet punaisia)

Kuvassa 31 a) on asetettu RB3  $\alpha$ -amylaasin rakennemalli ja *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylaasin kiderakenne (PDB id 1BLI) ja kuvassa 31 b) RB3 rakennemalli ja *B. subtilis*  $\alpha$ -amylaasin kiderakenne (1BAG) päällekkäin. *Bacillus*  $\alpha$ -amylaasien B-domeenit on värjätty vihreällä, kuten johdannossa. 31 a-kuvassa nähdään, että molempien  $\alpha$ -amylaasien B-domeenit ovat rakenteeltaan samanlaiset, eli muodostuvat kahdesta pitemmästä ja kahdesta hyvin lyhyestä beta-juosteesta sekä niiden välisestä satunnaiskierteestä. 31 b-kuvassa taas nähdään, että B-domeenit ovat rakenteeltaan erilaiset, koska *B. subtilis*  $\alpha$ -amylaasissa on kaksi lyhyttä alfa-kierrettä, ja kolme lyhyttä beta-juostetta. Kuvassa 31 b muuallakin proteiinien sekundaarirakenteet sijaitsevat (muutamien Ångströmin verran) eri kohdissa, joskin A ja C-domeeneissa niiden topologia on sama. Nähdään siis, että *Exiguobacterium sp.* RB3  $\alpha$ -amylaasin mallinnettu rakenne on kauttaaltaan hyvin samanlainen kuin *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylaasin kiderakenne, ja että se on erityisesti B-domeeniltään erilainen kuin *B. subtilis*  $\alpha$ -amylaasin rakenne. A-kuvasta nähdään, että kolme tärkeintä katalyyttistä aminohappoa ovat samoissa kohdissa, ja kuvasta 31 b nähdään suunnilleen, miten substraatti sitoutuu RB3  $\alpha$ -amylaasiin.

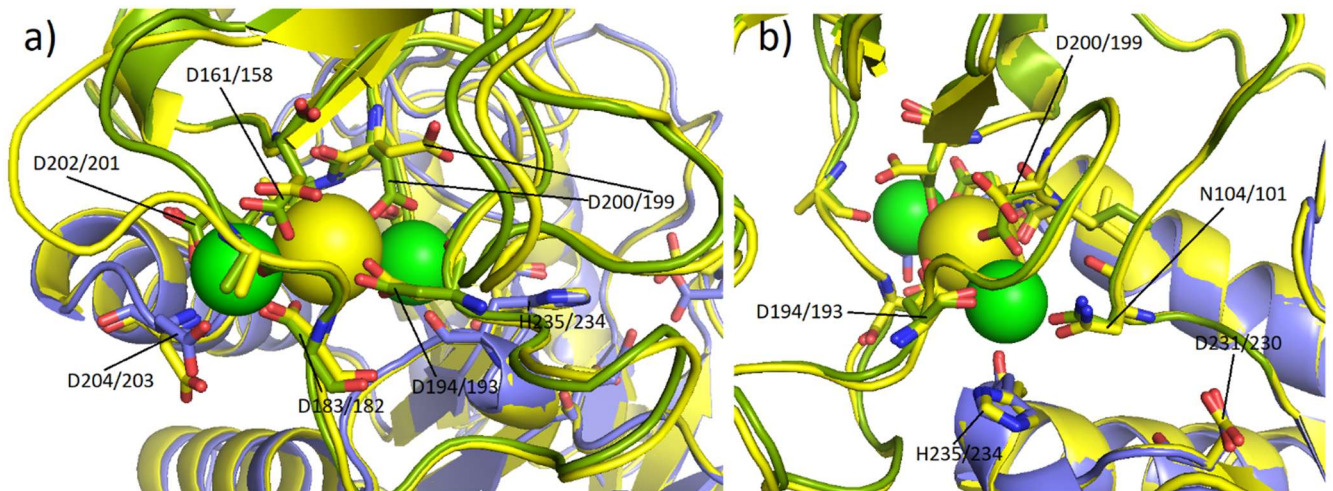


Kuva 32 *Exiguobacterium* RB3 ja a) DAU5 b) SH3  $\alpha$ -amylaasien rakennemallit asetettu päällekkäin (superimposed). RB3 on keltainen, DAU5 magenta, ja SH3 turkoosi, katalyyttisen triadin aminohapot on esitetty tikkumalleina

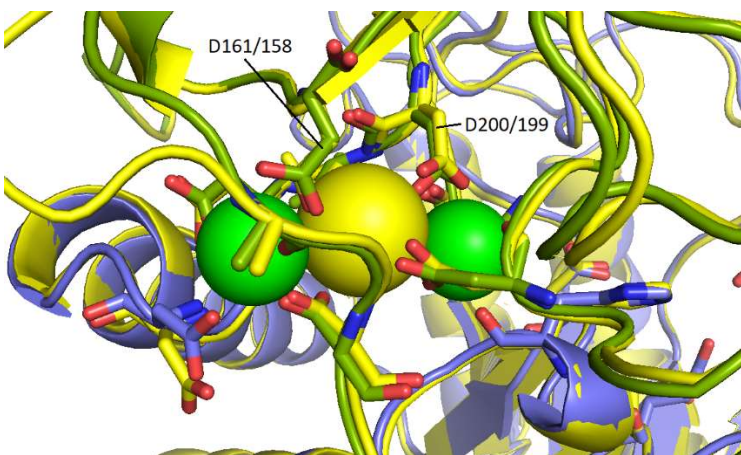
Kuvasta 32 a) nähdään, että RB3 (keltainen) ja DAU5 (magenta)  $\alpha$ -amylaasien rakennemallit asettuvat hyvin päällekkäin eli ovat hyvin samanlaiset, ja myös etuylhäällä näkyvä B-domeeni on niissä rakenteeltaan samanlainen. Kuvasta 32 b) taas nähdään, että RB3 (keltainen) ja SH3 (turkoosi) rakennemallit eivät asetu yhtä hyvin päällekkäin koska ne ovat erilaiset. Etuylhäällä näkyvä B-domeenin rakenne on näissä erilainen. Kahta RB3:n pitkää beta-juostetta ei nähdä SH3:n mallissa. Toisaalta SH3:ssa on lyhyt  $\alpha$ -kierre (yksi kierros) jota ei ole RB3:ssa, ja ei ole niin paljon satunnaiskierrettä kuin RB3:ssa.

Kuvissa 33 a) ja b) nähdään eri suunnista *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylaasin B-domeenin kalsium- ja natriumatomit sekä tikkumallena Machius ym. (1998) mukaan niitä sitovat aminohapot, ja niille *Exiguobacterium sp.* RB3  $\alpha$ -amylaasissa homologiset aminohapot, jotka siis määritetty kuvan 29 linjauksen avulla. Nähdään, että RB3  $\alpha$ -amylaasissa ne sijaitsevat samalla tavalla paitsi D158 ja D199 sivuketjujen konformaatiot ovat erilaiset. Kokeiltiin muuttaa näiden konformaatiot PyMolissa samoiksi kuin *B. licheniformis*ksessa ilman että sivuketjut törmäivät muihin aminohappoihin, mikä oli mahdollista ja muutetut konformaatiot nähdään kuvassa 34. Kalsiumeja ja natriumia sitovien sivuketju- ja karbonyylihappien sijainnin

välimatkat *B. licheniformis* kiderakenteen ja RB3  $\alpha$ -amylaasin rakennemallin välillä vaihtelvat 0,1 – 1,0 Å välillä 0,3 ja 0,4 Å ollessa tyypillisimmät, paitsi D204/203 kohdalla etäisyys on 2,7 Å.

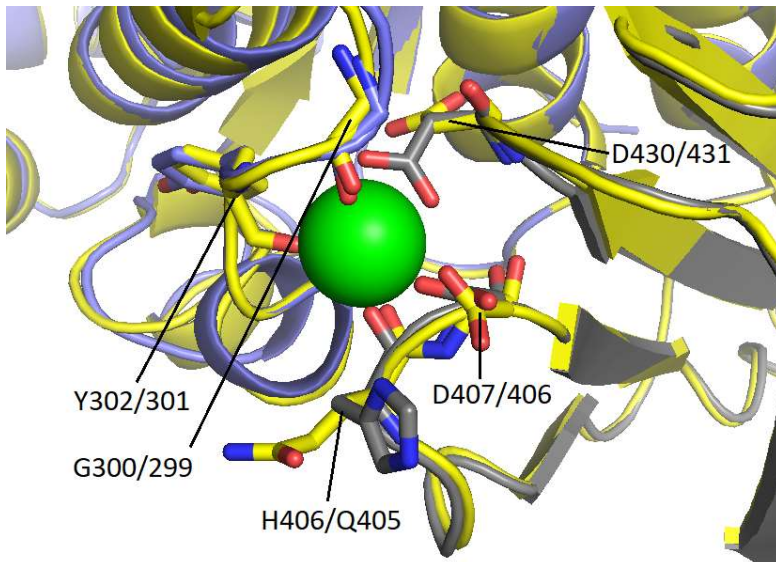


Kuva 33 *Exiguobacterium* RB3  $\alpha$ -amylaasin rakennemallista osa joka vastaa *B. licheniformis* (1BLI) rakenteen B-domeenin kalsiumeja ja natriumia sekä niitä sitovia aminohappoja. Sitovat aminohapot ja katalyyttinen D231/230 tikkumalleina. Ca vihreät pallot, Na keltainen isompi pallo. Numeroinnissa ensin *B. licheniformis* sitten *Exiguobacterium* RB3. Värity: RB3 keltainen, *B. licheniformis* A-domeeni sininen ja B-domeeni vihreä



Kuva 34 *Exiguobacterium* sp. RB3  $\alpha$ -amylaasin D158 ja D199 aminohappojen sivuketjujen konformaatiot muutettu käsin samoiksi kuin *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylaasissa. Muuten kuten kuva 33

Kuvassa 35 nähdään *B. licheniformis* (1BLI)  $\alpha$ -amylaasin toinen, A- ja C-domeenien välinen kalsiumin sitomiskohta (Machius ym. 1998), sekä vastaava RB3  $\alpha$ -amylaasissa. Nähdään että RB3  $\alpha$ -amylaasissa *B. licheniformis* Gly301 ja Tyr302 ovat konservoituneet ja niiden karbonyylihapet sijaitsevat samoissa kohdissa. His406 on mutatoitunut glutamiiniksi. *B. licheniformis* aspartaatit ovat konservoituneet RB3:ssa mutta sivuketjujen konformaatiot ovat mallissa eri. Tässäkin tapauksessa sivuketjujen konformaatiot oli mahdollista muuttaa samoiksi kuin *B. licheniformis* sessä. Silloin niiden sijainnin poikkemat *B. licheniformis* seen verrattuna olivat 0,5 Å ja 0,7 Å.



Kuva 35 *Exiguobacterium* RB3  $\alpha$ -amylaasin rakennemallin kohta joka vastaa *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylaasin A- ja C-domeenien välillä olevaa kalsiumia ja sitä sitovia aminohappoja. Sitovat aminohapot esitetty tikkumalleina. RB3 malli keltainen, *B. licheniformis* A-domeeni sininen, C-domeeni harmaa

## Tulosten tarkastelu

Endo- $\beta$ -1,4-glukanaasin puhdistaminen *Bacillus* sp. ABM5119 kannasta onnistui vain kahdella puhdistusvaiheella

*Bacillus*-suvun endo- $\beta$ -1,4-glukanaasien puhdistamisesta on lukuisia julkaisuja (mm. Mäntsälä & Zalkin 1979, Najafi ym. 2005), sekä myös rakennetutkimuksia (Santos ym. 2012). Näissä entsyymien puhdistamiseen on käytetty ammoniumsulfaattisaostusta, sekä DEAE-, ja SP-ioninvaihto-, sekä geelisuodatuskromatografioita, joten odotettavissa oli, että myös *Bacillus* sp. ABM5119 entsyymi voitiin näillä menetelmillä puhdistaa.

Kuvan 8 *Bacillus* sp. ABM5119 supernatanttien CMC-tsymogrammista, pääteltiin b-kuvan kaistojen 3 ja 5 hydrolyysijuovien perusteella endo- $\beta$ -1,4-glukanaasin olevan noin 42-44 kDa proteiini, ja tämä toistuu kuvan 21 a CMC-tsymogrammissa. Se, että näillä kaistoilla näkyy vain yhdet hydrolyysijuovat, osoittaa myös, että kanta ei eritä mitään toista selvästi eri molekyylipainoista entsyymiä jolla olisi endo- $\beta$ -1,4-glukanaasiaktiivisuutta. Kuvan 8 a kaistojen 3 ja 5 perusteella nähtiin, että preparaateissa on kaksi tämän kokoista proteiinia. Tsymogrammin hydrolyysijuova on kuitenkin niin leveä, ettei tästä saatu vielä selvää kumpi näistä proteiineista on endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi (vaiko molemmat jos pienemmän MW:n juova on proteolyysituote).

Taulukossa 2 nähtävä kasvatusliemen supernatantin konsentroinnin, ja puskurilla pesujen yhteydessä saavutettu puhdistuskertoimen nousu 2,6:een todennäköisesti johtuu siitä, että YP-liemen peptideistä osa näkyy Bradfordin menetelmässä proteiininä, ja nämä peptidit ovat riittävän pieniä suodattuaakseen (10 kDa suodatusrajan) Amicon-ultrasuodatusmembraaneista läpi. Kuvan 8 a perusteella tiedettiin, että konsentroidussa supernatantissa on runsaasti proteiineja joiden molekyylipaino on alle 50 kDa. Käytettävissä oli ultrasuodatusmembraaneja joiden pitäisi retentoida vain yli 50 kDa proteiinit, joten päätettiin kokeilla saisiko endo- $\beta$ -1,4-glukanaasinerotettua sillä pienemmän

molekyylipainon proteiineistä. Aktiivisuuden perusteella endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi jäi retentaattiin, ja SDS-PAGE:n perusteella lähes kaikki muutkin (myös alle 50 kDa) proteiinit jäivät siihen, joten preparaatti ei juurikaan puhdistunut, ja siksi 50 kDa ultrasuodatusmembraania ei käytetty puhdistusmenetelmänä.

Seuraavaksi koko konsentroidulle supernatantille tehtiin DEAE-anioninvaihtokromatografia, jonka tulos näkyy kuvassa 9. Endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi jakautui kahteen kokonaisaktiivisuudeltaa suunnillee yhtä suureen piikkiin. Ensimmäinen ei ollut sitoutunut ioninvaihtajaan, ja jälkimmäinen oli. Tuloksesta voitiin päätellä, että jälkimmäisessä endo- $\beta$ -1,4-glukanaasipiikissä muiden proteiinien kuin endo- $\beta$ -1,4-glukanaasin määrä on pienempi, koska sen aktiivisuus suhteessa proteiinipitoisuuteen on suurempi, ja siten yhdistämällä ne saa puhtaamman preparaatin. Siten jälkimmäisen piikin fraktiot yhdistettiin, ja jatkettiin puhdistusta niillä. Koska vain toinen piikki käytettiin, laski endo- $\beta$ -1,4-glukanaasin saanto reilusti (31%:iin), kuten taulukosta 2 nähdään. Kokonaisaktiivisuuden olisi kuitenkin pitänyt laskea vain puoleen siitä mitä konsentraatissa oli, joten aktiivisuuden laskuun on joku muukin syy, mutta se jää epäselväksi.

Ammoniumsulfaattisaostuksessa suurin osa endo- $\beta$ -1,4-glukanaasista päätyi 70-80 ja 80-90 saturaatio-% fraktioihin ja 90 saturaatio-% supernatanttiin, mutta osa myös muihin fraktioihin, koska aktiivisuutta on muissakin fraktioissa (kuva 10) ja kuvan 11 SDS-PAGEN kaikissa fraktioissa nähdään noin 44 kDa proteiinijuova, joka vastaa kuva 8 b tsymogrammin noin 42-44 kDa kokoista aktiivisuusjuovaa. Tämä selittää myös saannon alenemista ammoniumsulfaattisaostuksessa (ks. taulukko 2). Ilmeisesti osa endo- $\beta$ -1,4-glukanaasista myös menetti aktiivisuutensa koska puhdistuskerroin ei ammoniumsulfaattisaostuksessa noussut, kuten nähdään taulukosta 2.  $\alpha$ -amylaasi ja proteaasi päätyivät 40-60 saturaatio-% fraktioon kuvan 10 määritysten perusteella. Kuvan 11 SDS-PAGE:n perusteella kontaminantit päätyivät lähinnä 40-60, ja 60-70 saturaatio-% fraktioihin. 80-90 saturaatio-% fraktiossa endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi oli kontaminoivista  $\alpha$ -amylaasi-, ja proteaasiaktiivisuuksista puhdas kuvan 10 määritysten perusteella, ja kuvan 11 perusteella 80-90 sat.-% fraktion arvioitiin olevan noin 90%:sesti 44 kDa proteiinia, eli endo- $\beta$ -1,4-glukanaasia. Ainut näkyvä kontaminantti oli jokin yli 170 kDa proteiini jota oli hyvin vähän. Kuvan 22 a kaistojen 2, 3, ja 4 perusteella ABM 5119:n  $\alpha$ -amylaasi on ~60 kDa proteiini, jollaista ei 80-90 sat.-% AS-fraktiossa SDS-PAGE:n mukaan ole, joten aktiivisuusmääritysten lisäksi myös SDS-PAGEN ja tsymografioiden perusteella endo- $\beta$ -1,4-glukanaasipreparaatti on  $\alpha$ -amylaasista puhdas. Kuvan 21 b tsymogrammin perusteella ABM5119 DEAE-fraktioista yhdistetyssä preparaatissa ei ollut ksylanaasia, joten myöskään ammoniumsulfaattisaostuksen fraktioissa ei voinut olla ksylanaasia. Ksylanaasia ei tosin havaittu kasvatusliemessäkään (tulosta ei näkyvillä).

ABM5119 kannan endo- $\beta$ -1,4-glukanaasia,  $\alpha$ -amylaasia tai proteaasia ei karakterisoitu sen tarkemmin, koska ei ollut syytä olettaa niillä olevan tieteellisesti uutta annettavaa, koska *Bacillus* suvun erittämiä entsyymejä on tutkittu paljon. SDS-PAGE:n  $\pm 10\%$  erotuskyky huomioiden 42-44 kDa molekyylipaino on samanlainen kuin esim. Santos ym. (2012) (45 kDa), Mawadza ym. (2000) (40 kDa) ja Fierobe ym. (1993) (41 ja 48 kDa) karakterisoimilla endo- $\beta$ -1,4-glukanaaseilla, mutta selvästi eri kuin *B. macerans*  $\beta$ -1,3-1,4-endoglukanaasin 25 kDa (Hahn ym. 1995). Eli molekyylipaino vastaa GH5 ryhmän endo- $\beta$ -1,4-glukanaasia, ja on eri kuin GH16 ryhmän  $\beta$ -1,3-1,4-endoglukanaasilla, eli molyylipaino viittaa GH5 entsyymiin jollainen *Bacillus* sp. ABM5119 kannalla arveltiin johdannossa olevan.

$\alpha$ -amylaasin puhdistus *Exiguobacterium* sp. RB3 kannasta onnistui riittävän hyvin ja sivutuotteena saatiin puhdas proteaasi

*Exiguobacterium* sp. RB3  $\alpha$ -amylaasin puhdistukseen päätettiin käyttää samoja menetelmiä kuin *Bacillus* sp. ABM5119 endo- $\beta$ -1,4-glukanasin puhdistukseen, eli DEAE-anioninvaihtokromatografiaa ja ammoniumsulfaattisaostusta. Kasvatusliemi sentrifugoitiin, konsentroidiin ja pestiin DEAE-kromatografian puskurilla. Kuten taulukosta kolme nähdään, jo tässä vaiheessa saavutettiin puhdistumista. Tämä johtunee samasta syystä kuin ABM5119 endo- $\beta$ -1,4-glukanasin puhdistuksessa, eli ultrasuodatusmembraanien pidätysrajaa pienemmät peptidit ovat menneet niistä läpi.

Kuvasta 12 nähdään, että DEAE-kromatografiassa  $\alpha$ -amylaasi ja proteaasi eluoituivat pylväästä jo ennen NaCl-gradientin alkua, eli ne eivät sitoutuneet anioninvaihtajaan. Varsinkin kun yksi kontaminanteista oli proteaasi, joka siis saattaa hajottaa  $\alpha$ -amylaasin, niin olisi hyvä saada se erilleen  $\alpha$ -amylaasista, ja siten tämä puhdistuvaihe ei toiminut parhaalla mahdollisella tavalla. Kuitenkin DEAE-kromatografialla päästiin eroon noin kolmasosasta muita proteiineja. Vertaamalla kuvien 13 ja 15 kaistojen kolme ja neljä proteiinijuovia, nähdään että DEAE-kromatografia poisti joitakin proteiineja, jotka ovat molekyylipainoltaan hyvin lähellä  $\alpha$ -amylaasia jonka molekyylipainoksi saatiin kuvassa 17 näkyvällä tsymogrammilla 60 kDa. Amylaasigeenin nukleotidisekvenssistä transloidun aminohapposekvenssin perusteella  $\alpha$ -amylaasin molekyylipainoksi saatiin 54362 Da, mikä on SDS-PAGE:n  $\pm 10$  % erotuskyvyn huomioiden sama.

Seuraavaksi tehtiin ammoniumsulfaattisaostuksen pilottikoe pienellä määrällä yhdistettyä DEAE-fraktiota. Kuten kuvasta 14 nähdään  $\alpha$ -amylaasi alkoi saostua 50 saturaatio-% pitoisuudella, mutta korkeammilla pitoisuuksilla aktiivisuutta ei ole vaikka sitä pitäisi olla jos jo 50 saturaatio-%:lla se saostuu. Lisäksi  $\alpha$ -amylaasiaktiivisuuden pitäisi olla samaa suuruusluokkaan kuin DEAE-yhdistetyssä fraktiossa (ks taulukko 3), eli 50 % fraktiossa on siitä vain pieni osa. Proteaasi on alkanut saostua 50 saturaatio-% fraktiossa, ja suuremmilla ammoniumsulfaattipitoisuuksilla sitä on reilusti. Jotta menetelmää voisi käyttää puhdistukseen pitäisi  $\alpha$ -amylaasin ja proteaasin saostua eri ammoniumsulfaattipitoisuuksilla, ja nyt näin ei ole. Kuvan 15 SDS-PAGE:n kaistojen 7-10 perusteella  $\alpha$ -amylaasiproteiinia ei ole fraktioissa koska, kuten kuvan 17  $\alpha$ -amylaasitsymogrammista nähdään, se on noin 60 kDa proteiini, jollaista ei kuvan 15 kaistoilla 7-10 näy. Lähin niillä näkyvä juova on noin 70 kDa proteiini. Preparaatti konsentroidui ammoniumsulfaattisaostuksessa, jolloin proteaasiaktiivisuus tilavuusyksikköä kohden moninkertaistui, ja ilmeisesti tällöin proteaasi aiheutti  $\alpha$ -amylaasin hajoamisen. Vertaamalla kuvan 14 määrittymiä ja kuvan 15 SDS-PAGEa fraktioista, nähdään että proteaasiaktiivisuus korreloi vahvimman noin 37 kDa proteiinijuovan ja sen alapuolisten heikkojen juovien kanssa. Siten saattaa olla, että  $\sim 37$  kDa proteiini on *Exiguobacterium* RB3:n erittämä proteaasi. Kun 60 – 90 % fraktiot ovat  $\alpha$ -amylaasiaktiivisuudesta puhtaita, sekä entsyymimäärityksen että SDS-PAGE:n perusteella, niin niissä olisi ollut kaurakuitukokeen kannalta riittävän puhdasta proteaasia. Tätä ei kuitenkaan ymmärretty kuin vasta sen jälkeen, kun kaurakuitukokeet oli tehty, ja siksi tätä proteaasia ei käytetty niihin, vaan sen sijaan kaupallista proteiinaasi K preparaattia. Proteaasia saatiin hyvin vähän koska DEAE-yhdistetystä fraktiosta käytettiin saostukseen vain pieni osa.  $\alpha$ -amylaasin puhdistamisen kannalta johtopäätös kokeesta oli, että ammoniumsulfaattisaostus ei sovellu käytettäväksi.

Seuraavaksi harkittiin geelisuodatuksen tai HiTrap SP kationinvaihtokromatografian käyttöä puhdistuksen toisessa vaiheessa. Kun epäiltiin, että proteaasi on noin 37 kDa proteiini ja  $\alpha$ -amylaasi noin 60 kDa proteiini, arvioitiin, ettei geelisuodatuksella ehkä saataisi näitä erilleen ja päätettiin jatkaa kationinvaihdolla.

HiTrap sulfopropyli (SP) kationinvaihdossa (kuva 16) suurin osa proteiineista ei tarttunut ioninvaihtajaan siitä päätellen, että kuvan 16 mukaisesti heti eluution alussa fraktioiden 2-5 kohdalla on proteiinipitoisuuspiikki. Myöskään  $\alpha$ -amylaasi ei tarttunut, mutta sen piikki on muutaman fraktion verran proteiinipitoisuuspiikkiä jäljessä. Tätä päätettiin käyttää hyväksi ja yhdistää fraktiot 5-10, jotta  $\alpha$ -amylaasipreparaattiin tulisi mahdollisimman vähän muita proteiineja. Proteaasi oli eluoinut selvästi erillään, lähinnä fraktioon 33, eikä fraktioissa 5-10 havaittu proteaasiaktiivisuutta. Taulukon 4 entsyymiaktiivisuusmäärittelyissä proteaasiaktiivisuutta havaittiin, mutta se ei eroa tilastollisesti merkitsevästi nolasta, kun otetaan huomioon myös se, että määrittelyksen blankissa on hajontaa. Siten  $\alpha$ -amylaasi katsottiin puhtaaksi proteaasista, eli kaurakuitukokeiden puhtausvaatimus oli saavutettu. Kuvassa 17 kaistalla seitsemän näkyy SDS-PAGE analyysi HiTrap fraktioista 5-10 yhdistetystä fraktiosta. Siinä vahvin proteiinijuova on samalla 60 kDa molekyylipainoa vastaavalla korkeudella kuin saman geelin toisesta puoliskosta tehdyn  $\alpha$ -amylaasitsymografian hydrolyysijuova kaistoilla 2-4. Kaistalla neljä näkyy varsinaisen hydrolyysijuovan yläpuolellakin vaaleaa aluetta. Se todennäköisesti johtuu siitä, että kaikki  $\alpha$ -amylaasi ei ole denaturoitunut, tai on ajon aikana osittain renaturoitunut, joka voi olla mahdollista koska RB3  $\alpha$ -amylaasi on 49 % aktiivinen 1% SDS:ssä, kuten 20 analyysistä nähdään. Vastaava ilmiö nähdään ABM5119 endoglukanaasilla kuvan 8 b kaistalla 4, jossa 60 °C lämpötilassa denaturoitu endoglukanaasi ei ole edennyt geelissä kuten 95 °C denaturoitu vaan on jäänyt kaistan yläpään pitkäköksi hydrolyysialueeksi.

Kuvassa 17 kaistalla kahdeksan on HiTrap SP kromatografian fraktio kolme, jossa vahvin proteiinijuova on noin 70 kDa, ja siinä ei edes näy 60 kDa proteiinijuovaa  $\alpha$ -amylaasista. Kromatografiafraktioista 5-10 yhdistetyn amylaasipreparaatin kaistalla seitsemän 70 kDa juova taas on  $\alpha$ -amylaasi 60 kDa juovaa heikompi. Tämä vahvistaa sen, että kationinvaihdon fraktiot ennen fr. 5 kannatti jättää pois lopullisesta preparaatista. HiTrap fraktioista 5-10 yhdistettyä preparaattia käytettiin  $\alpha$ -amylaasin biokemiallisien ominaisuuksien määrittelyyn ja kaurakuitukokeisiin.

Taulukosta 3 nähdään *Exiguobacterium*  $\alpha$ -amylaasin puhdistuksen eteneminen. Kokonaisaktiivisuus ja saanto ovat konsentraatissa matalammat kuin supernatantissa ja seuraavassa vaiheessa eli DEAE-kromatografian yhdistetyssä fraktiossa. Tämä voi selittyä siten, että konsentraatissa ollut suuri proteaasiaktiivisuus tuhosi osan  $\alpha$ -amylaasista  $\alpha$ -amylaasiaktiivisuuden määrittelyksen aikana madaltaen mitattua aktiivisuutta, eli todellisuudessa aktiivisuus konsentraatissa olisi suurempi. DEAE-anioninvaihtokromatografiasta yhdistetyssä preparaatissa saanto palautui 98 %:iin, spesifinen aktiivisuus ja puhdistuskerroin nousivat mikä kuvaa preparaatin puhdistumista. Tämän jälkeen preparaatti pakastettiin. Ennen pakastusta testattiin kestäkö se sitä, ja tulos oli että 71% aktiivisuudesta olisi jäljellä sulatettaessa. DEAE-fraktiota sulatettaessa sitä pidettiin noin 15 min huoneenlämpöisessä vesihauteessa. Sulattamisen ja kationinvaihtokromatografiaa varten konsentroidin jälkeen saanto oli laskenut 13 %:iin. Todennäköisesti vesihauteessa inkuboimisen aikana proteaasi on hajottanut  $\alpha$ -amylaasia, ja sulatus olisi pitänyt tehdä hitaammin kylmemmässä. Myöhemmin määrittelyistä ylijääneen pakastetun HiTrap yhdistetyn fraktion aktiivisuus sulatuksen jälkeen on sama, mikä tukee sitä ettei aktiivisuuden lasku johdu pakastamisesta ja sulatuksesta sinänsä vaan proteaasista. Puhdistuksen aikana havaittiin myös, että proteaasiaktiivisuus häviää myös jotenkin muuten kuin puhdistamalla, siis muuten kuin esim. siten että se kromatografiassa päätyisi eri fraktioon. Voi olla, että proteaasi hydrolysoi itseään tai se jotenkin spontaanisti denaturoituu puhdistuksessa käytetyissä olosuhteissa kuten pH:ssa 8.

On siis ilmeistä, että tätä puhdistusta hankaloitti preparaatissa ollut proteaasi. Koska proteaasi tarttui kationinvaihtajaan, ja  $\alpha$ -amylaasi ei, niin jos puhdistus tehtäisiin uudelleen, kannattaisi ensin tehdä kationinvaihto. Sitten voisi puhdistaa  $\alpha$ -

amylaasia lisää anioninvaihtajalla tai mahdollisesti myös ammoniumsulfaattisaostus voisi toimia kun proteaasia ei olisi enää hajottamassa  $\alpha$ -amylaasia.

Kun  $\alpha$ -amylaasipreparaatti arvioitiin SDS-PAGE:n ja tsmografian perusteella noin 60% puhtaaksi saatiin  $\alpha$ -amylaasille laskettua spesifinen aktiivisuus, 532 CU/mg (mikä siis on entsyymin ominaisuus,  $\alpha$ -amylaasipreparaatin spesifinen aktiivisuus oli 319 CU/mg).

### *Exiguobacterium* sp. RB3 $\alpha$ -amylaasin turnover number eli $k_{cat}$ vakio saattaa olla poikkeuksellisen suuri

Turnover numberiksi saatiin 29000 1/s ja aktiivisuus on määritetty 40 °C:ssa pH:ssa 7,0. Rivera ym. (2003) mukaan turnover number *B. stearothermophilus*  $\alpha$ -amylaasilla 60 °C:ssa on 19000 1/s, *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylaasilla 80 °C:ssa 1200 1/s, ja sen V286T mutantilla 6900 1/s. Takase (1993) mukaan *B. stearothermophilus*  $\alpha$ -amylaasin  $k_{cat}$  60 °C:ssa on 9060 1/s ja 37 °C:ssa 2130 1/s. Chang ym. (2013) mukaan se on *Exiguobacterium* sp. DAU5  $\alpha$ -amylaasilla 3470 1/s pH:ssa 8,5 ja 40 °C:ssa. Siten RB3  $\alpha$ -amylaasille saatu tulos on epäilyttävän suuri. Red Starch  $\alpha$ -amylaasimäärityksessä tehtiin sekä valotien pituudesta johtuva korjaus (kerroin 2,5), että käytetystä aallonpituudesta johtuva korjaus (kerroin 1,435), ja saattaa herätä epäily, että jompi kumpi näistä aiheuttaisi virheen. Kuitenkin molemmat niistä on välttämätöntä tehdä, jotta aktiivisuus saadaan laskettua oikein. Lisäksi kun saadun turnover number -arvon jakaa kertoimilla erikseen tai yhdessä saadaan edelleen korkeita arvoja (11600, 20200, ja 8080 1/s), joten korjauskertoimien poistaminen ei muuta tilannetta. Siten vika tuskin on korjauskertoimissa. Yksi mahdollinen virhelähde on SDS-PAGE:n perustuva arvio  $\alpha$ -amylaasipreparaatin  $\alpha$ -amylaasiproteiinin osuudesta koko preparaatin proteiineista, mutta sekään ei yksinään selitä saatua tulosta. Ainut mahdollisuus olisi, että useat edellämainitut tekijät, ja esim. mahdolliset virheet proteiinipitoisuus- ja entsyymiaktiivisuusmäärityksissä, olisivat yhdessä vaikuttaneet siten, että turnover number on noussut, mutta tämä on epätodennäköistä. Koska selvää virhettä ei ole löydetty, ei voida poissulkea sitä, että tällä  $\alpha$ -amylaasilla todella olisi poikkeuksellisen suurin turnover number. Koska *Exiguobacterium* sp. RB3 kannan  $\alpha$ -amylaasin sekvenssille hyvin samankaltainen löytyy *E. sibiricum* 255-15 kannasta (ks. taulukko 10), joka on psykrofiili (Vishinivetskaya ym. 2009), saattavat sen ja RB3 kannan  $\alpha$ -amylaasit olla poikkeuksellisen aktiivisia matalissa lämpötiloissa, ja se saavutetaan yleensä proteiinin joustavuudella, mikä voi ehkä nostaa sen aktiivisuutta myös korkeammassa lämpötiloissa kuten tässä käytetyssä 40 °C:ssa. Kylmässä aktiivisuuden ja turnover numberin selvittämiseksi pitäisi tehdä uusia mittauksia, kuten analyysi aktiivisuudesta lämpötilan funktiona, ja aktiivisuusmittauksia muilla määritysmenetelmillä, mutta tämän työn puitteissa siihen ei ollut mahdollisuutta. Jos tämä suure todella olisi näin korkea niin se tekisi tästä  $\alpha$ -amylaasista kiinnostavan, koska tämän  $\alpha$ -amylaasin perusteella voisi esimerkiksi saada selville miten jo käytössä olevien teollisten  $\alpha$ -amylaasien aktiivisuutta voisi nostaa, jolloin tätä kannattaisi tutkia.

### RB3 kannan $\alpha$ -amylaasi on neutraalissa pH:ssa aktiivinen

Kuvan 18 analyysin mukaan aktiivisuuden huippu on pH:ssa 6,5 ja aktiivisimmillaan se on alueella 5,0 – 7,5. Keitetyn SOF-kaurakuidun pH on 6,5 (Kivelä ym. 2009), joten  $\alpha$ -amylaasin aktiivisuusmaksimi on optimaalinen kaurakuitukokeiden kannalta. Kun SOF-kaurakuituun on lisätty käymiskelpoista sokeria, esim. glukoosia, niin bakteerifermentaation aikana pH laskee 4,5 – 5,0:aan. Kuvan 18 perusteella tämä  $\alpha$ -amylaasi säilyttää aktiivisuutensa myös silloin. Kun *Exiguobacterium* sp. RB3 kannalla fermentoidaan pelkkää SOF-kaurakuitua, pH nousee 6,5:sta 8,5:een



(Korhola ym. julkaisemattomat tulokset), ja kuvan 18 perusteella tässä tapauksessa aktiivisuus laskee, muttei edelleenkään häviä kokonaan. Tämä osaltaan selittää sitä miksi tämä kanta alentaa keitetyn kaurakuidun viskositeettia riippumatta glukoosin lisäyksestä

Kuvan 18 pH-aktiivisuuskäyrä ei ole normaalijakauman kaltainen, vaikka usein entsyymeillä se on. pH-alueella 5,0 – 6,5 aktiivisuus nousee lineaarisesti, mutta keskihajonnat huomioiden on mahdollista, että aktiivisuus todellisuudessa kehittyisi normaalijakauman muotoisesti tällä alueella. Jakauma ei ole symmetrinen, vaan vasen laita on jyrkempi, kuin oikea. Tämä on tyypillistä amylaaseissa ja sama havaitaan mm. *Bacillus amyloliquefaciensin*  $\alpha$ -amylaasin ja sen mutanttien (Bessler ym. 2003), Nielsen ym. (2001) karakterisoimien  $\alpha$ -amylaasin, ja *Exiguobacterium sp.* SH3  $\alpha$ -amylaasin (Mojallali ym. 2014) kanssa. Lisäksi ainakin yhdessä teollisessa alkaalisissa amylaaseissa käyrä on oikealle kallellaan, eli vasen laita nousee hitaammin, kuin oikea laita laskee (patentti EP 1637596). Eräillä kahdella teollisella alkaalisella  $\alpha$ -amylaasilla pH optimi on 8,0 (patentti EP 1637596), mikä ei ole kovin paljon suurempi kuin esim. RB3:lla. Ne kuitenkin säilyttävät pH:ssa 9,0 aktiivisuudestaan 95 % kun RB3 kannan  $\alpha$ -amylaasi säilyttää vain 31 %, korkeammassa pH:ssa ero kasvaa niiden eduksi, ja ne säilyttävät aktiivisuudesta noin 20 % vielä pH:ssa 11. RB3  $\alpha$ -amylaasin aktiivisuus pH:ssa 11 on käytännössä nolla (keskiarvo 2 %). Siten RB3 kannan  $\alpha$ -amylaasi ei ole tarpeeksi aktiivinen todella emäksisessä pH:ssa 10-11, ja se ei sovellu pesuaineisiin.

Kuvassa 19 esitetystä logaritmoidusta aktiivisuudesta pH:n funktiona voitiin laskea nukleofiilin (Asp230) pKa:ksi 5,0 ja happo-emäs katalyytin (Glu260) pKa:ksi 7,9 silloin kun substraatti on entsyymiin sitoutuneena (Voet & Voet 2004, 487). Tulokset ovat sikäli aivan uskottavia, että nukleofiilin tulisi olla negatiivisesti varautunut entsyymien aktiivisella pH alueella, ja happo-emäs katalyytissä taas tulee olla reaktion alussa protoni, kuten johdannossa glykosyylihydrolaasien toiminta kappaleessa todetaan (ks. kuva 4). Glutamaatin sivuketjun karboksyyli ryhmän normaali pKa on 4,1 (Voet & Voet 2004, 67), joten pKa on noussut 3,8 pH yksikköä, minkä todennäköisesti aiheuttaa katalyyttiseen triadiin (Machovic & Janecek 2003) kuuluva Asp327, joka identifioitiin kuvan 28 linjauksen avulla. Muissa amylaaseissa tätä vastaava Asp nostaa happo-emäs katalyytin pKa:ta (Fujimoto ym. 1998, Brzozowski ym. 1997), niin todennäköisesti RB3  $\alpha$ -amylaasissakin sen aiheuttaa tämä.

## RB3 $\alpha$ -amylaasin SDS:n ja pesuainedetergenttien toleranssi on kohtalainen

Kuvan 20 analysista nähdään, että RB3  $\alpha$ -amylaasi säilyttää noin puolet aktiivisuudesta 1 % (w/v) eli 10 g/L SDS:ssa, ja 3,7 g/L pyykinpesuaineessa (Bio Luvil), eli se kestää detergenttejä tietyssä määrin, ja myös sellaisia joita kaupallisissa pesuaineissa käytetään (aktiivisuus BioLuvilin detergenteissa ei tilastollisesti merkitsevästi eroa 1% SDS aktiivisuudesta vaikkakin saatu arvo on matalampi). Se että SDS alentaa aktiivisuutta 0,1 % ja 1 % konsentraatioilla yhtä paljon oli odottamaton tulos, koska konsentraation kasvaessa pitäisi aktiivisuuden laskea enemmän. Chang ym. (2013) mukaan *Exiguobacterium* DAU5  $\alpha$ -amylaasin aktiivisuus 5 mM SDS:ssa on nolla. 5 mM SDS vastaa 1,44 g/L eli 0,14 % SDS:ia, joten RB3 kannan  $\alpha$ -amylaasi sietää SDS:ia selvästi paremmin. Enampour ym. (2015) mukaan *Exiguobacterium sp.* SH3  $\alpha$ -amylaasin aktiivisuus 5 mM SDS:ssa on 85 % normaalista, joten se sietää SDS:ia pienemmillä pitoisuuksilla RB3  $\alpha$ -amylaasia paremmin. Outoa tässä on se, että sekvenssin ja rakenteen väliset erot ovat RB3 ja DAU5  $\alpha$ -amylaasien välillä pienemmät kuin RB3 ja SH3  $\alpha$ -amylaasien välillä (taulukko 10, kuvat 32 a ja b).

*Exiguobacterium* sp. RB3 kannan  $\alpha$ -amylaasi on sekvenssiltään samanlainen kuin psykoofilisissä *Exiguobacterium*-lajeissa esiintyvät  $\alpha$ -amylaasisekvenssit

BLASTin avulla voitiin todeta aminohapposekvenssin olevan 97% sama kuin *E. sibiricum* 255-15 kannan genomista löytyvä  $\alpha$ -amylaasi (Taulukko 10). Kuten taulukosta 10 nähdään, kuudessa ensimmäisessä osumassa sekvenssien identtisyys on selvästi yli 90 % mutta seitsemänneistä, joka on *Exiguobacterium* sp. DAU5  $\alpha$ -amylaasi, alkaen alle 77 %. Tämä viittaa siihen, että RB3  $\alpha$ -amylaasi ja nämä kuusi ensimmäistä muodostaisivat yhden ryhmän sekvenssejä, ja Chang ym. (2013) karakterisoima *Exiguobacterium* sp. DAU5  $\alpha$ -amylaasi ja sen kaltaiset toisen ryhmän. *Exiguobacterium* sp. SH3 kannan  $\alpha$ -amylaasi ei näy näissä tuloksissa koska se eroaa näistä enemmän, joten sille homologiset  $\alpha$ -amylaasit muodostaisivat vielä oman ryhmänsä sekvenssejä. Tehtäessä lisää Blast-hakuja  $\alpha$ -amylaasisekvenssien linjausta varten löydettiin DAU5 ja SH3 kantojen  $\alpha$ -amylaaseille homologisia sekvenssejä muutama lisää.

Linjauksen, josta olennainen osa kuvissa 28 ja 29, perusteella nähdään, että sekvenssiltään RB3 kannan  $\alpha$ -amylaasille samankaltaisimmat  $\alpha$ -amylaasit löytyvät *E. sibiricum*, *E. antarcticum*, *E. undae* ja *E. oxitolerans* lajeista (linjauksen ylälaidan sekvenssit). Etsittäessä SH3 kannan  $\alpha$ -amylaasin kaltaisia amylaaseja, Blast-hauissa oli löytynyt  $\alpha$ -amylaasisekvenssejä peräisin näistä samoista lajeista ja myös samoista kannoista, eli tietyissä kannoissa oli kaksi amylaasigeeniä. Tällaisia olivat mm. *E. sibiricum* 255-15, *E. undae* DSM14481, *E. antarcticum* B7 ja *E. oxitolerans* N4-1P kannat. Vishnivetskaya ym. (2009) mukaan nämä lajit kuuluvat *Exiguobacterium*-suvun ryhmään I jonka lajit ovat psykoofilisiä. Linjauksessa käytetyistä sekvensseistä useat ovat peräisin samoista kannoista joita käytettiin Vishnivetskaya ym. (2009) tutkimuksessa. Tällä perusteella vaikuttaa todennäköiseltä, että RB3 kannassammekin on kaksi  $\alpha$ -amylaasia. Mistä sitten tiedetään, onko kloonattu ja sekvensoitu  $\alpha$ -amylaasigeeni juuri se jota bakteeri on ekspressoanut, eli se minkä koodaama proteiini on puhdistettu ja karakterisoitu? Kuvan 20 määrittämisen perusteella RB3 kannan erittämä  $\alpha$ -amylaasi sitoo kalsiumeja, koska EDTA vaikuttaa sen aktiivisuuteen. Enampour ym. (2015) mukaan SH3 amylaasin aktiivisuuden kelaattori ei vaikuta. Myös tässä työssä tehty linjaus ja rakenteiden vertailu tukevat tätä SH3 amylaasin ominaisuutta kuten myöhempanä kerrotaan. Jos RB3 kannan erittämä  $\alpha$ -amylaasi olisi ollut SH3  $\alpha$ -amylaasin tyyppinen niin EDTA:lla ei olisi vaikutusta aktiivisuuteen. Toki voi olla, että puhdistetussa preparaattissa on itse asiassa näiden kahden  $\alpha$ -amylaasin seos, mutta siinä ei voi olla SH3 tyyppistä  $\alpha$ -amylaasia kuin pieni osa tai muuten ei olisi mahdollista, että EDTA laskee aktiivisuutta niin paljon (87 %).

Vishnivetskaya ym. (2009) mukaan *E. marinum*, *E. aurantiacum*, *E. mexicanum*, *E. profundum* lajit ja *E. sp.* AT1b kanta kuuluvat (jossain määrin) termofiiliseen *Exiguobacterium*-suvun ryhmään II, ja osa ryhmän II lajeista on eristetty merestä tai järvestä. Chang ym. (2013) mukaan *Exiguobacterium* sp. DAU5 kanta on eristetty meressä kasvaneen katkaravun kuorista. Näyttää siltä, että *Exiguobacterium*  $\alpha$ -amylaasien sekvenssit jakautuvat samalla tavalla kuin *Exiguobacterium*-suvun lajit jakautuvat psykoofilisiin ja termofiilisiin-akvaattisiin kantoihin.

### *Exiguobacterium* $\alpha$ -amylaasien mallit vaikuttavat tarkoilta

Kuvasta 30 nähdään, että tässä tapauksessa kuitenkin kaikki viisi Robettalla tuotettua mallia ovat käytännössä samat, eli proteiinin selkäranka on kaikissa sama, ja vain sivuketjujen konformaation suhteen on eroja, eli mallinnusalgoritmin mukaan mallissa ei ole epäselvyyttä proteiinin selkärangan sijainnissa. Tämä tarkkuus riittää esimerkiksi eri entsyymien B-domeenin sekundaarirakenteiden sijaintia ja tyyppiä koskevien vertailuihin. Tuloksissa kuvastuu B-domeenin

kalsiumeja ja natriumia sitovien aminohappojen happien etäisyydet *B. licheniformis* amylaasin vastaaviin ovat välillä 0,1-1,0 Å, joka alittaa kiderakennemallin resoluution joka yleensä noin 2 Å. Siten ei ole syytä epäillä mallin olevan ainakaan B-domeenin osalta virheellinen. Mallin todellinen tarkkuus selviäisi vain määrittämällä proteiini kiderakenne mikä ei tässä työssä ole mahdollista.

### *Exiguobacterium* sp. RB3 ja DAU5 kantojen $\alpha$ -amylaasit ovat rakenteeltaan samanlaisia kuin *Bacillus licheniformis* $\alpha$ -amylaasi

Kuvasta 31 a nähdään, että *Exiguobacterium* sp. RB3 mallin rakenne on käytännössä sama kuin *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylaasilla (PDB: 1BLI, Machius ym. 1998). Siten *Exiguobacterium* sp. RB3  $\alpha$ -amylaasi on selvästi GH13-ryhmän entsyymi, ja kuuluu myös samaan GH13 alaryhmään numero viisi *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylaasin kanssa (Stam ym. 2006). Kun RB3  $\alpha$ -amylaasin rakennemallia vertaa *B. subtilis*  $\alpha$ -amylaasiin (kuva 31 b) niin nähdään, että rakenne on esim. B-domeenissa erilainen tavalla joka on kuvattu tuloksissa. Se, että B-domeenit eroavat eniten sopii hyvin siihen, että tämä domeeni on  $\alpha$ -amylaaseissa vaihtelevin (Machius ym. 1998). Kuvan 31 b perusteella *Exiguobacterium* RB3 ja *B. subtilis*  $\alpha$ -amylaasien A- ja C-domeenien rakenteet eivät asetu täydellisesti päällekkäin, mutta sekundaarirakenteet ovat samat, niiden topologia on sama, ja ne ovat suunnilleen samoissa kohdissa. Siten erot A- ja C-domeeneissa *Exiguobacterium* RB3 ja *B. subtilis*  $\alpha$ -amylaasien välillä ovat vähäisempiä. Kuvissa 33 a ja b, 34 ja 35 on näytetty, että kalsiumeja ja natriumia sitovat kohdat B-domeenissa ja A- ja C-domeenin välissä ovat *Exiguobacterium* RB3 ja *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylaaseissa samanlaiset, tosin tiettyjen aminohappojen sivuketjujen rotameerit täytyi manuaalisesti korjata.

*Exiguobacterium* RB3 ja DAU5 kantojen  $\alpha$ -amylaasien rakennemalleja verrattiin keskenään kuvassa 32 a, ja todettiin niiden olevan samanlaisia. Siten biokemialliset erot esim. detergenttitoleranssissa täytyvät selittyä vain proteiinin primaarirakenteen eroilla.

### *Exiguobacterium* RB3 $\alpha$ -amylaasin kofaktorina on kalsiumioneja kuten amylaaseissa yleensäkin

Kuvan 20 määrittämisestä näkyy, että EDTA, joka kelatoi divalentit kationit, alentaa aktiivisuutta. Tämä viittaa siihen, että  $\text{Ca}^{2+}$  on RB3  $\alpha$ -amylaasin kofaktori. Useilla  $\alpha$ -amylaaseilla on yhdestä kolmeen kalsiumia osana rakennetta (Brzozowski & Davies 1997, Fujimoto ym. 1998, Machius ym. 1998, Suvd ym. 2001, Shirai ym. 2007). Kuvien 28 ja 29 sekvenssien linjauksesta nähdään, että kaikki *B. licheniformis* B-domeenin kalsiumeja ja natriumia sitovat aminohapot löytyvät *Exiguobacterium* sp. RB3, *Exiguobacterium* sp. DAU5 ja niiden kaltaisista amylaaseista (*B. subtilis*  $\alpha$ -amylaasin H180 vastaa *B. licheniformis* H235). Kuvissa 33 a ja b ja 34 on esitetty missä nämä aminohapot sijaitsevat *Exiguobacterium* sp. RB3 ja *B. licheniformis* rakenteissa, ja nähdään että manuaalisten korjausten jälkeen sijainti on sama muiden paitsi aspartaattien D204/203 kohdalla. Machius ym. (1998) mukaan *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylaasin B-domeenin konformaatiot ilman metalleja ja niiden kanssa ovat erilaiset, ja metallien sitoutuminen muuttaa konformaatiota siten, että aktiivisen keskuksen yksi reuna muodostuu. Metallien puuttuminen aiheuttanee konformaatiomuutoksen, joka estää substraatin sitomista alentaen aktiivisuutta, kuten havaitaan kuvan 20 määrittämisessä.

Kuvassa 35 nähdään *Exiguobacterium* sp. RB3 ja *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylaasien rakenne *B. licheniformis* A- ja C-domeenien välillä olevan kalsiumin kohdalta. Histidiinin 406 mutatoituminen glutamiiniksi (405) ei haittaa koska kalsiumia sitoo

näiden karbonyylihappi. Jälleen manuaalisten korjausten jälkeen myös tämä kalsiumin sitoutumiskohta löytyy RB3  $\alpha$ -amylaasista, ja on samanlainen kuin *B. licheniformis* rakenteessa.

Edellä esitetyn perusteella *Exiguobacterium sp.* RB3  $\alpha$ -amylaasi sitoo kolme kalsiumia, ja yhden natriumin rakenteeseensa.

*Exiguobacterium sp.* SH3  $\alpha$ -amylaasin rakenne eroaa RB3 ja DAU5  $\alpha$ -amylaasien rakenteista *Exiguobacterium* RB3  $\alpha$ -amylaasin rakenne on tietyssä määrin erilainen kuin *Exiguobacterium* SH3:n kuten kuvasta 32 b nähdään. Erityisesti B-domeenit ovat erilaiset, kuten tuloksissa kuvataan. Myös kuvan 29 B-domeenin linjauksessa nähdään SH3  $\alpha$ -amylaasissa ja sen kaltaisissa amylaaseissa deleetioita jotka ovat samoissa kohdissa kuin *B. subtilis* (1BAG) sekvenssissä. Kalsiumeja ja natriumia sitovia aminohappoja ei deleetioiden takia löydy, eli se ei sido kalsiumia B-domeeniinsa. Linjaus ja SH3  $\alpha$ -amylaasin mallinnettu rakenne siis sopii Enampour ym. (2015) väitteeseen, ettei tämä  $\alpha$ -amylaasi sido kalsiumia, ja siten se on erilainen entsyymi kuin RB3 kannan  $\alpha$ -amylaasi.

## Kaupalliset entsyymipreparaatit sisälsivät useita aktiivisuuksia

Kaurakuidun viskositeetikokeisiin käytettyjen preparaattien aktiivisuudet on koottu taulukkoon 4. Kuten jo edellä on todettu, olivat puhdistettu  $\alpha$ -amylaasi ja  $\beta$ -1,4-endoglukanaasi muista aktiivisuuksista puhtaat, kuten taulukosta 4 voidaan nähdä ( $\alpha$ -amylaasin proteaasiaktiivisuus ei eroa nolasta tilastollisesti merkitsevästi, kun otetaan huomioon blankin hajonta).

Entsyymiaktiivisuusmäärittäyksillä ja tsymogrammeilla todettiin, että Lysing enzymessä oli  $\alpha$ -amylaasia,  $\beta$ -1,4-endoglukanaasia ja proteaasia, ja että siinä ei ollut ksylanaasia (kuva 21 b). Koska siinä oli kaurakuitukokeen kannalta kaikkia kolmea keskeistä aktiivisuutta, päätettiin, että sitä ei käytetä kaurakuidun viskositeetikokeisiin, koska sillä ei saisi mitään selvää siitä missä määrin eri aktiivisuudet alentavat viskositeettia.

Kuten taulukosta neljä nähdään, Aquazym<sup>®</sup>in  $\alpha$ -amylaasiaktiivisuus oli suuri, kuten pitäisikin koska se on sen ilmoitettu aktiivisuus. Kuvan 22 a  $\alpha$ -amylaasitsymogrammin perusteella sen  $\alpha$ -amylaasi on noin 60 kDa proteiini, kuten *Bacillus sp.* ABM5119:n ja *Exiguobacterium sp.* RB3:n  $\alpha$ -amylaasit. Taulukon 4 entsyymiaktiivisuuksien mukaan Aquazymissa on endo- $\beta$ -1,4-glukanaasia alle tuhannesosa  $\alpha$ -amylaasiaktiivisuudesta, ja CMC-tsymogrammissa tätä ei edes havaittu (kuva 21 a). Kun preparaattia laitettiin kaurakuitupreparaatin entsyymihydrolyysikokeisiin niin vähän, että  $\alpha$ -amylaasiaktiivisuutta tuli esim. 9 tai 0,9 mCU/ml, niin endo- $\beta$ -1,4-glukanaasiaktiivisuus niissä on todella pieni. Aquazym<sup>®</sup>in ksylanaasiaktiivisuus on alle sadasosa  $\alpha$ -amylaasiaktiivisuudesta, joten on hämmästyttävää, jos alle 0,09 mU/ml ksylanaasia vaikuttaisi viskositeettiin merkittävästi. Se havaittiin myös kuvan 21 b tsymogrammissa noin 30 kDa hydrolyysijuovana ja proteiinina. Proteaasiaktiivisuutta havaittiin myös, mutta sekin on  $\alpha$ -amylaasiaktiivisuuteen verrattuna pieni, vain 1,5 %. Aquazym ei siis ole puhdas ja sisältää  $\alpha$ -amylaasia, ksylanaasia, proteaasia, hyvin vähän endo- $\beta$ -1,4-glukanaasia. Siten se voi toimia kaurakuitupreparaatin hajotuksen positiivisena kontrollina.

Denimaxista haivaittiin endo- $\beta$ -1,4-glukanaasia, joka on sen ilmoitettu aktiivisuus. On kuitenkin yllättävää, että Denimaxin ksylanaasiaktiivisuus on suurempi kuin endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi aktiivisuus (taulukko 4), ja että ksylanaaseja on siinä neljä ainakin molekyylipainoltaan erilaista (kuva 21 b).

Tsymogramissa käytetty ksylaani ei voi olla  $\beta$ -1,4-sidoksia sisältävillä glukaaneilla kontaminoitunutta, koska kuvan 21 b tsymogrammissa ABM5119 endo- $\beta$ -1,4-glukanaasipreparaattien kaistoilla seitsemän ja kahdeksan ei näy hydrolyysijuovia. Siten ksylanaasitsymogrammin hydrolyysijuovat varmuudella tulevat ksylanaaseista, eikä sellulaaseista. Denimaxista havaittiin myös proteaasiaktiivisuutta, muttei juurikaan  $\alpha$ -amylaasiaktiivisuutta. Siten se sisältää ksylanaasia, endo- $\beta$ -1,4-glukanaasia, ja proteaasia. Sitä päätettiin käyttää toisena kaurakuidun hajotuksen positiivisena kontrollina koska siinä oli osin eri aktiivisuuksia kuin Aquazymissä.

## $\alpha$ -amylaasi ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi alensivat kaurakuitupreparaatin viskositeettia, proteaasi ei

Puhdistetuilla endo- $\beta$ -1,4-glukanaasilla ja  $\alpha$ -amylaasilla, sekä puhdistamattomilla teollisuusentsyymipreparaateilla ja proteaasi K:lla tehtiin kolme sarjaa kokeita, joissa SOF-kaurakuidusta keitettyä velliä hydrolysoitiin entsyymeillä lämpimässä, kokeissa yksi ja kaksi kylmäsäilytettiin noin kaksi viikkoa, ja lopulta mitattiin näiden ja käsittelemättömien kontrollien viskositeetit. Johtuen eri olosuhteista ja siitä, että keitetyn kaurakuitupreparaatin viskositeetti vaihtelee erästä toiseen, kuten taulukoiden 5, 7 ja 9 kontrolleista nähdään (2439, 1158 ja 2036 mPas), ei näitä kokeita voida niputtaa yhteen siten, että esim. endo- $\beta$ -1,4-glukanaasin aiheuttama viskositeetin alenema laskettaisiin vain keskiarvona kaikista mitatuista sillä käsitellyistä tapauksista. Kuitenkin eri kokeissa saatuja tuloksi voi verrata toisiinsa pitäen mielessä erot. (Entsyymikäsittelemättömän) SOF-kaurakuitupreparaatin viskositeetti on selvästi korkeampi kuin Mäkinen ym. (2012) tukimuksessa. Tämä johtuu siitä, että tässä työssä kaurakuitu keitettiin, ja Mäkinen ym. (2012) uuttivat siitä lähinnä  $\beta$ -glukaanin 50 °C lämpötilassa, jolloin tärkkelys ei gelatinisoidu. Tässä työssä kaurakuitupreparaatti keitettiin siksi, että haluttiin aluksi hyvin viskoosi liuos, jossa on kaikkia viskositeettia aiheuttavia polysakkarideja.

Hieman merkillistä on, että vedelle saatiin viskositeetiksi 2,0 mPas kun sen viskositeetin pitäisi olla 1,0 mPas mittauksen 20 °C lämpötilassa, tosin leikkausnopeudella 100 1/s saatiin sille 1,2 mPas. Tämä poikkeama viittaa siihen, että viskosimetrin kalibraatio ei ehkä ole ollut aivan kohdallaan. Mahdollinen siitä aiheutuva virhe on systemaattinen, ja siten ei esim. vaikuta siihen paljonko jonkin entsyymikäsitteilyn viskositeetti on suhteessa kontrollien keskiarvoon.

Ensimmäisessä kokeessa RB3 kannan puhdistetulla  $\alpha$ -amylaasilla viskositeetti aleni 67 %, eli 33 %:iin kontrollista (tulukko 5) ja p-arvo kontrolliin on 0,00008 (taulukko 6), eli alenema on selvästi tilastollisesti merkityksellinen. Kolmannessa kokeessa  $\alpha$ -amylaasilla viskositeetti laski 73%, eli 27%:iin kontrollista (taulukko 9). Näiden perusteella puhdas  $\alpha$ -amylaasi alentaa viskositeetin noin 30 %:iin. Kim ja White (2012) mukaan kaurajauhosta tehdyn velliin viskositeetti aleni  $\alpha$ -amylaasilla 13 %:iin, joka on selvästi eri tulos. Toisaalta Kim & White käyttämä lämpötila viskositeetin mittauksessa (40 °C ja 90 °C) sekä ilmeisesti myös leikkausnopeus ovat erilaiset, mitkä vaikuttavat saatuun viskositeettiin. Kokeessa kaksi RB3 kannan puskurilla pestyllä supernatantilla käsitellyissä viskositeetti oli alentunut 47 %:iin kontrollista, eli vähemmän kuin puhtaalla  $\alpha$ -amylaasilla käsitelyissä. Siten RB3 kanta ei ole ainakaan YP+2 mM CaCl<sub>2</sub> alustassa kasvatettaessa erittänyt jotain havaitsematta jäänyttä entsyymiä joka hydrolysoisi jotain kaurakuidun komponenttia alentaen viskositeettia. Osittain ero tämän ja puhdistettujen välillä voi johtua siitäkin, että kokeessa kaksi kontrollien viskositeetti, 1158 mPas (taulukko 7) on puolet pienempi kuin kokeissa yksi (2439 mPas) ja kolme (2036 mPas). Jos se olisi ollut samankaltainen olisi supernatantilla käsitellyn viskositeetti noin 25 %:ia kontrollista eli samaa suuruusluokkaa kuin kolmannessa kokeessa.

*Bacillus sp.* ABM5119:stä puhdistettu endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi laski yksinään viskositeettia kolmannessa kokeessa 34 %:iin kontrollista, eli alenema oli 66 % (taulukko 9). Tämä on hyvin linjassa Kim & White (2012) tuloksen 62,5 % ja Liun (2010) tulosten 50 – 80 % kanssa. Ensimmäisessä ja toisessa kokeessa, joissa inkubaatio lämpimässä on pidempi ja lisäksi sen jälkeen on tehty kahden viikon kylmäsäilytys, puhdistetulla endo- $\beta$ -1,4-glukanaasilla käsiteltyjen viskositeetti on alentunut enemmän, esim. 7,1 %:iin kontrollista (alenema 92,9 %) (taulukko 5). Lisäksi liuos on käyttäytynyt Newtonisen nesteen tavoin 10 – 100 1/s leikkausnopeuksilla. Se, että samassakin kokeessa kahden viikon säilytyksen jälkeen eri viskositeetin hajonta on useita kymmeniä prosentteja, on asiaan kuuluvaa, koska Kivelä ym. (2009) saivat omista kokeistaan samanlaista hajontaa kahden viikon kohdalla. Kim & White (2012) sekä Liu (2010) ovat käyttäneet  $\beta$ -1,3-1,4-endoglukanaasia, joten tässä työssä saatujen tulosten perusteella sekä endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi että  $\beta$ -1,3-1,4-glukanaasi alentavat liukoisen  $\beta$ -1,3-1,4-glukaanin viskositeettia yhtä hyvin, mikä sopii siihen, että endo- $\beta$ -1,4-glukanaasille yleensä käy substraatiksi myös  $\beta$ -glukaani, kuten johdannossa todettiin. Mitä tulee endo- $\beta$ -1,4-glukanaasin inhiboitumiseen selluloosalla (Fernandez ym. 2016), niin tuloksista nähdään, että *Bacillus sp.* ABM5119 endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi ei ole inhiboitunut ainakaan siinä määrin, että keitetyn kaurakuidun viskositeetti säilyisi, jos on inhiboitunut ollenkaan. Kim & White (2012) käyttivät  $\beta$ -1,3-1,4-endoglukanaasia, jonka ei pitäisi inhiboitua selluloosalla johtuen siitä, ettei selluloosa sovi sen aktiiviseen kohtaan. Koska tässä saatu alenema on joko sama (kolmas koe) tai jopa suurempi (ensimmäinen ja toinen koe) kuin heidän tuloksensa voidaan päätellä, että selluloosa ei estä *Bacillus sp.* ABM5119 endo- $\beta$ -1,4-glukanaasia on hajottamasta liukoisen  $\beta$ -glukaanin missään määrin.

Toisen kokeen p-arvot nähdään taulukossa 8. Niiden mukaan toisessa kokeessa millään käsittelyllä ei kontrolliin verrattuna ole ollut p-arvoa alle 0,05, eli usein käytetyn sallivimman tilastollisen merkitsevyyden perinteisen rajan alittavaa arvoa. Kannattaa kuitenkin huomata, että tässä kokeessa kontrolleja oli kaksi, kun ensimmäisessä oli neljä, jolloin niiden hajonta voi tuurilla muodostua suuremmaksi, mikä vaikuttaa p-arvoihin. Kokeessa kaksi kontrollien hajonnasta laskettu variaatiokerroin 12,4 % (taulukko 7) onkin suurempi kuin ensimmäisessä kokeessa saatu 4,7 % (taulukko 5, luku 0,047 on prosentteina 4,7 %), mikä viittaa siihen että juuri näin olisi käynyt. Lisäksi taulukossa 8 useat kontrollin ja käsittelyn väliset p-arvot ovat lähellä 0,05:tä esim. endo- $\beta$ -1,4-glukanaasilla 0,052. Toisaalta taulukosta 8 nähdään myös, että RB3 supernatantti ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi välillä olisi p-arvo 0,014 mikä alle 0,05, eli tilastollisesti merkitsevä, vaikka samalla RB3 supernatantti ja käsittelemätön kontrolli välillä on p-arvo 0,080. Kokeissa olisi ilmeisesti pitänyt käyttää ainakin kolmea rinnakkaista reaktiota ja kontrollia, jotta tältä olisi vältytty. Ensimmäisessä kokeessa jossa kontrolleja on neljä ovat p-arvot paljon pienemmät, mikä tukee tätä. Kun toinen koe on tehty muuten samoin paitsi inkubaatiolämpötila ja -aika ovat eri, niin olisi väärin väittää, ettei toisen kokeen tuloksilla olisi mitään merkitystä. Tilastollisesti merkityksettöminä eroina pidettiin toisessa kokeessa mm. kontrollin ja proteinaasi K:n eroa ( $p=0,088$ ), Aquazym ja Aquazym ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasin eroa ( $p=0,873$ ), ja ABM5119 DEAE-fraktio 7 ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi välistä eroa ( $p=0,224$ ). RB3 supernatantti ja käsittelemätön kontrolli välisen p-arvon 0,08 tilastollinen merkitsevyys on epäselvä.

Kuten jo todettiin, on RB3  $\alpha$ -amylaasilla saatu viskositeetin alenema pienempi kuin Kim & White (2012)  $\alpha$ -amylaasilla saama. Mahdollisesti RB3  $\alpha$ -amylaasi ei ole hajottanut kaikkea tärkkelystä vaan on menettänyt aktiivisuutensa kesken hydrolyysin. SOF-kaurakuitu on hyvin köyhää metallikationeista. Mäkinen ym. (2012) mukaan siinä on rautaa 171 ng/g kuivapainosta, josta voidaan laskea 3,5 % (w/v) liukselle pitoisuudeksi 0,1 nmol/L. Kalsiumin pitoisuutta ei ole määritetty mutta voidaan olettaa, että se on samaa suuruusluokkaa, ja siten huomattavasti matalampi kuin esim.

entsyymimääriyksissä käytetty 1 mmol/L. Kalsiumin puute laskee RB3  $\alpha$ -amylaasin aktiivisuutta kuvan 20 (EDTA) määriyksen mukaan, johtuen aiemmin esitetystä rakenteellisista syistä. Siten RB3  $\alpha$ -amylaasin denaturoiminen johtunee kalsiumkofaktorien irtoamisesta. Jos kuituvellin viskositeetin alenemisesta entsyymeillä tehtäisiin jatkotutkimuksia, niin kuituvelliin tulisi lisätä kalsiumia, esim. 1 mM CaCl<sub>2</sub> sen varmistamiseksi, että RB3  $\alpha$ -amylaasin (ja muidenkin amylaasin) kalsiumkofaktorit pysyvät entsyymissä, eikä se niiden dissosioitumisen takia denaturoidu.

Aquazym ja Denimax teollisuusentsyymipreparaattien tarkoitus oli toimia positiivisina kontrolleina viskositeetin alenemiselle, johtuen niiden useista eri aktiivisuuksista ja näiden entsyymien oletetusta kestävydestä. Kuvien 23, 24 ja 25 ja taulukoiden 5, 7 ja 9 viskositeettituloksista nähdäänkin, että ne ovat romahduttaneet kaurakuitupreparaatin viskositeetin tasolle, joka vastaa veden viskositeettia (toisessa kokeessa kuvassa 24 oli kontrollina myös vesi). Taulukoiden kuusi ja kahdeksan p-arvot niiden välillä ovat reilusti yli 0,05 eli niiden viskositeetit eivät eroa toisistaan tilastollisesti merkitsevästi. Ilmeisesti ne ovat hydrolysoineet kaikki preparaatin polysakkaridit mono- tai oligomeereiksi, jotka eivät aiheuta viskositeettia. Tämä myös tarkoittaa sitä, että vaikka esim. Aquazymin endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi- ja toisaalta Denimaxin  $\alpha$ -amylaasiaktiivisuudet olivat hyvin pieniä, niin silti ne riittivät hajottamaan substraattinsa. Kaikista kokeista (kuvat 23, 24 ja 25) nähdään, että Aquazym aiheuttaa suuremman viskositeetin aleneman, kuin RB3  $\alpha$ -amylaasi. Tärkkelyksen on siis täytynyt hajota kokonaan, mikä edellyttää sitä, että Aquazymin  $\alpha$ -amylaasi on säilynyt aktiivisena. Aquazymissä oli myös ksylanaasia, mutta se ei aiheuta suurta viskositeetin laskua, koska suurin osa arabinoksyalaanista esiintyy liukenemattomina partikkeleina, ja siten ei aiheuta viskositeettia, ja lisäksi liukoista ksylaania ei ole SOF-preparaatissa tarpeeksi aiheuttamaan viskositeettia, sillä sitä on siinä vain 0,5 % kuivapainosta, kun taas  $\beta$ -glukaania on 30 % liukoisen materiaalin kuivapainosta (Kivelä ym. 2009). Todennäköisesti  $\beta$ -glukaanin on hajottanut Aquazymin endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi, vaikka sen aktiivisuus on ollut hyvin pieni. Lisäksi preparaatissa voi olla jotain tunnistamatonta glykosyylhydrolaasia. Esim.  $\beta$ -glukosidaasi ei olisi tullut tehdyissä määriyksissä esiin, koska ne ovat olleet endoaktiivisuuksille spesifisiä.

Proteinaasi K ei aiheuttanut viskositeetin laskua millään leikkausnopeudella kuten kuvasta 24 nähdään. Sillä käsitellyn kaurakuidun viskositeetti 10 1/s leikkausnopeudella oli  $1657 \pm 62,2$  kun kontrollin oli  $1158 \pm 143,5$ . Proteinaasi K käsitellyn viskositeetti oli siis suurempi kuin kontrollin, vaikka sen pitäisi olla pienempi. Kontrollin ja proteinaasi K käsitellyn välinen p-arvo on 0,088, mikä on yli 0,05, ja siten ainakin perinteisen tulkinnan mukaan tilastollisesti merkityksetön ero, eli tilastollisesti sen viskositeetti on sama kuin kontrollin ja vaikutusta ei havaita. Tämä on ristiriidassa Liun (2010), ja Kim & Whiten (2012) tulosten kanssa, joissa proteinaasi K alensi viskositeettiä selvästi. Syy eroon saattaa olla se, että tässä työssä kaurakuitu on keitetty, ja siten proteiinit ovat denaturoituneet jolloin ne lienevät aggregoituneet partikkeleiksi, jotka eivät aiheuta viskositeettia. Kim & Whiten (2012) tutkimuksessa kaurajauhot oli lämmitetty 90 asteeseen, joten voi ehkä olla, etteivät kaikki proteiinit ole siinä denaturoituneet, jolloin ne nostaisivat jonkin verran viskositeettia, joka sitten vastaavasti alenee hajottamalla nämä proteiinit proteaasilla. Se, että *Exiguobacterium*- $\alpha$ -amylaasin puhdistuksen yhteydessä puhtaaksi saatua proteaasia ei käytetty, oli toki virhe, mutta kun nyt käytettiin proteiinaasi K:ta kuten Kim & White (2012), niin ei voi väittää, että ero johtuisi siitä mitä proteaasia on käytetty. Toisessa kokeessa (kuva 24) käytettiin myös 5119 puhdistuksen DEAE fraktiota 7, joka sisältää  $\beta$ -1,4-endoglukanaasia ja proteaasia, mutta viskositeetti ei ole alentunut puhdasta endo- $\beta$ -1,4-glukanaasia enemmän tilastollisesti merkitsevästi koska p-arvo on 0,224 (taulukko 8). Siten sekään ei tue proteaasin vaikutusta viskositeettiin. Lisäksi RB3 kannan supernatantti ei alentanut

viskositeettia enemmän vaan vähemmän kuin sen puhdas  $\alpha$ -amylaasi, mikä taas viittaa siihen, ettei RB3 kannan proteaasilla ole vaikutusta viskositeettiin. Tällöin kolmessa eri tapauksessa kolmella eri proteaasilla viskositeetti ei laskenut. Siten päätelmä proteaasin vaikutuksesta on, että sillä ei ole vaikutusta kaurakuitupreparaatin viskositeettiin kun kuitupreparaatti on keitetty.

## $\beta$ -glukaani saattaa estää tärkkelyksen retrogradaatiota

SOF-kaurakuitupreparaatin entsyymi-inkubaation kestoa ja lämpötilaa vaihdeltiin, koska ei tiedetty vaikuttaako se, ja tätä haluttiin selvittää. Kuvien 23 ja 25 ja taulukoiden 5 ja 9 tulosten perusteella RB3  $\alpha$ -amylaasi on aiheuttanut suunnilleen saman viskositeetin aleneman riippumatta siitä, onko kylmäsäilytetty vai ei. Sen sijaan, kuten kuvassa 25 on havainnollistettu, endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi on laskenut viskositeettia enemmän suhteessa kontrolliin, kun inkubaatio lämpimässä (37 °C tai 28 °C) ja kylmäsäilytys 4 °C ovat kestäneet pidempään. Inkubaatio 9 tuntia 37 °C:ssa ja 23 tuntia 28 °C:ssa suunnilleen vastaavat toisiaan kemiallisten reaktioiden etenemisen osalta sillä 10 °C lämpötilan nousu kaksinkertaistaa nopeuden. Siten kummassakin hydrolyysin tulisi olla yhtä perusteellinen ja kylmäsäilytyksen keston tulisi olla merkitsevä tekijä. Koska viskositeetti on laskenut suhteessa kontrolliin, eikä vain absoluuttisesti, sen täytyy olla endo- $\beta$ -1,4-glukanaasikäsittelystä johtuvaa. Yksi selitys on, että endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi ei hydrolysoi  $\beta$ -glukaania lämpimässä inkubaatioaikana kokonaan ja jatkaa hydrolysointia kylmässä. Kariluoto ym. (2014) mikrobikasvatuksista saatujen tulosten mukaan *Bacillus sp.* ABM5119:llä fermentoidun kaurakuidun viskositeetti laskee kylmäsäilytyksen aikana, joten heidän tuloksensa tukee ainakin sitä, että viskositeetti laskee kylmäsäilytyksen aikana. Heidän tutkimuksensa ei kuitenkaan paljasta tarkempaa syytä tähän. Sen sijaan, että endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi jatkaisi hydrolyysiä kylmässä, voi ero johtua siitä, että  $\beta$ -glukaani jotenkin estää tärkkelyksen retrogradaatiota esim. takertumalla tärkkelysmolekyyleihin, ja nyt kun se on poistettu entsyymillä, etenee tärkkelyksen retrogradaatio vapaasti. Kuvissa 23, 24 ja 25  $\alpha$ -amylaasilla käsitellyissä ja kontrolloissa viskositeettikäyrä laskee selvästi leikkausnopeuden noustessa. Tästä voidaan päätellä, että näissä on jotain suuren molekyyliä painon molekyyliä, jonka  $\alpha$ -amylaasikäsittelyssä täytyy mitä ilmeisimmin olla  $\beta$ -glukaania. Outoa on se, että kokeissa joissa kylmäsäilytettiin eli kuvissa 23 ja 24 endo- $\beta$ -1,4-glukanaasilla käsitellyissä viskositeettikäyrät ovat lähes vaakasuoria, eli neste käyttäytyy lähes Newtonisen nesteen tavoin, ja siten mitään suuren molekyyliä painon molekyyliä ei pitäisi olla paljon, vaikka näissä kuitenkin pitäisi olla tärkkelystä jonka molekyyliä paino on samaa suuruusluokkaa (amyloosi) tai voi olla jopa suurempi kuin  $\beta$ -glukaanin (amylopektiini, ks.  $\beta$ -glukaani ja tärkkelys kappaleet johdannosta). Jos tärkkelys retrogradoituu, se menettää viskositeettiaan, ja saattaa alkaa käyttäytyä Newtonisen nesteen tavoin. Kolmannessa kokeessa, jossa ei kylmäsäilytetty, ovat sekä  $\alpha$ -amylaasilla että endo- $\beta$ -1,4-glukanaasilla, ja näillä molemmilla käsiteltyjen viskositeettikäyrät selvästi laskevat, eli kaikissa on jotain suuren molekyyliä painon molekyyliä jäljellä. Siten myös viskositeettikäyrien erilainen jyrkkyys eri kokeissa tukee sitä, että  $\beta$ -glukaani estää tärkkelyksen retrogradaatiota ja ylläpitää sen viskositeettia. Kun se on poistettu endo- $\beta$ -1,4-glukanaasilla niin tärkkelys retrogradoituu nopeammin. Kuitenkin tämän työn kokeiden perusteella edellä esitetty on lähinnä hypoteesi, ja tämän osoittaminen vaatisi lisää kokeita, joihin ei nyt ollut mahdollisuutta.

## Kaurakuidun entsyymihydrolyysikokeiden viskositeettitulokset selittävät aiemmat *Bacillus sp.* ABM5119 kannan mikrobifermentaatioiden viskositeettitulokset

Kariluoto ym. (2014) olivat tietyissä kokeissaan käsitelleet 20% ohrajauhovellin Termamyl- $\alpha$ -amylaasilla ja sitten fermentoineet tätä eri bakteereilla, eli tärkkelys oli hydrolysoitu jo ennen fermentointia ja siten vain lähinnä betaglukaani



aiheutti viskositeettia. Kariluoto ym. (2014) fermentoinnissa *Bacillus sp.* ABM5119 oli alentanut viskositeetin 20 mPas tasolle. Tämän työn kokeissa (kuvat 23, 24 ja 25) oli olosuhde endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi ja  $\alpha$ -amylaasi, jota voi verrata Kariluoto ym. (2014) tulokseen. Kyseisessä Kariluoto ym. (2014) kokeessa yksi näytteistä oli fermentoitu ABM5119:lla 24 h 28 °C lämpötilassa, ja sitten kylmäsäilytetty kaksi viikkoa. Tämän työn toisessa viskositeetikokeessa entsyymeillä käsiteltiin 23 h 28 °C, ja sitten kylmäsäilytettiin 12 d 4 °C lämpötilassa, joten nämä ovat olosuhteiltaan samat. Kariluoto ym. (2014) mukaan *Bacillus sp.* ABM5119:llä fermentoidun viskositeetti oli 20 mPas leikkausnopeuksilla 0,3 - 300 1/s. Endo- $\beta$ -1,4-glukanaasilla ja  $\alpha$ -amylaasilla käsiteltyjen viskositeetit leikkausnopeuksilla 10 1/s olivat ensimmäisessä kokeessa  $23 \pm 3$  mPas, eli sama kuin Kariluoto ym. (2014) tulos. Toki näissä on se ero, että tässä työssä on 3,5 % SOF kaurakuitupreparaattia ja Kariluoto ym. (2014) ovat käyttäneet 20 % ohrajauhoa, mutta jos olettaa hydrolyysin olevan täydellinen pitkän säilytyksen takia, ja että molemmissa viskositeetin aiheuttaa tärkkelys ja  $\beta$ -glukaani, jota toki molemmissa on (Wood ym. 1991), niin silloin lähtötilanteen pitoisuuksilla ei ole väliä. Koska entsyymikäsitelyillä saatiin sama viskositeetti, kuin fermentoimalla bakteerilla, tarkoittaa se sitä, että *Bacillus sp.* ABM5119 kannan aiheuttama viskositeetin lasku johtuu sen erittämästä  $\alpha$ -amylaasista ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasista, eikä esim. aerobisessa metaboliassa syntyneistä hydroksyyliiradikaaleista. Lisäksi Fola fibre-projektin aikana oli saatu julkaisemattomia tuloksia joissa autoklavoimattomalla 3,5% SOF kaurakuidulla ABM5119 kanta alentaa viskositeetin 24 tunnissa noin 140 mPas tasolle. Kolmannessa kokeessa jossa kylmäsäilytystä ei ollut oli endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi ja  $\alpha$ -amylaasi -käsitellyn viskositeetti 237 mPas (10 1/s, taulukko 9). Siinä inkubaatio oli yhdeksän tuntia 28 °C. Kariluoto ym. (2014) olivat saaneet *Bacillus sp.* ABM5119:llä 8 h fermentaation jälkeen viskositeetiksi  $400 \pm 170$  mPas leikkausnopeudella 10 1/s, joka ei eroa tämän työn kolmannen kokeen tuloksesta tilastollisesti merkitsevästi. Kolmannen kokeen tulos on noin kaksinkertainen verrattuna em. julkaisemattomaan ABM5119 kannan 24h tuloksesta eli  $\sim 140$  mPas. Kun ottaa huomioon, että näissä käsitellyissä viskositeetti laskee suhteessa kontrolliin 10 ja jopa 1000 kertaisesti, niin ainakin nämä ovat samaa suuruusluokkaa, mikä jälleen viittaa siihen, että *Bacillus sp.* ABM5119 aiheuttamat viskositeetin alenemat johtuvat sen erittämästä entsyymeistä, eikä niinkään joistain muista syistä.

Kariluoto ym. (2014) kommentoivat tulostensa tarkastelussa ristiriitaa ”beta-glukanaasiaktiivisuuden” puutteen siis  $\beta$ -1,3-1,4-endoglukanaasin puutteen ja viskositeetin alenemisen välillä, siten että Herranen ym. (2010) tutkimuksen entsyymiaktiivisuuksien maljamääritysmenelmä ei olisi ollut tarpeeksi herkkä. Tässä työssä saatujen tulosten perusteella viskositeetin alenemisessa ei ole väliä onko käytetty aktiivisuus  $\beta$ -1,3-1,4-glukanaasi vai endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi. Molemmat hajottavat liukoista  $\beta$ -1,3-1,4-glukaania yhtä hyvin. Herranen ym. (2010) mukaan *Bacillus sp.* ABM5119 on tuottanut endo- $\beta$ -1,4-glukanaasia, joten syy Kariluoto ym. (2014) päätelmään on ollut se, että tämä aktiivisuus on jätetty huomiotta, ei niinkään jokin maljamääritysmenetelmän epäherkkyyks.

Näissä kokeissa puhtaalla  $\alpha$ -amylaasilla ja RB3 kannan konsentroidulla supernatantilla, joka sisältää  $\alpha$ -amylaasia ja proteaasia, käsitellyissä viskositeetin alenemat ovat suunnilleen samat. Tämä tarkoittaa, ettei *Exiguobacterium sp.* RB3 kanta eritä mitään muuta kaurakuitupreparaatin viskositeettiä selvästi alentavaa entsyymiä, eli glykosyylihydrolaasia tai proteaasia, ainakaan kun se on kasvatettu YP + 2 mM CaCl<sub>2</sub> kasvatusliemessä. Tämä ei täysin todista, etteikö se voisi tuottaa kasvaessaan kaurakuidulla myös jotain muutakin, mutta näiden kokeiden perusteella ainakin on mahdollista, että *Exiguobacterium sp.* RB3 aiheuttama viskositeetin alenema johtuu pelkästään sen  $\alpha$ -amylaasin erityksestä. Ongelma tämän selvittämisessä on ollut, että kaurakuidulla kasvatettaessa sen (ja muidenkin) mikrobien erittämät aktiivisuudet ovat olleet

hyvin matalia ja hankalia mitata tilastollisesti merkitsevästi. Fermentoitua kaurakuitua ei voi konsentroida ultrasuodatuksella viskositeetin takia, ja ammoniumsulfaattisaostuksessa muodostuu liukenematonta kiinteää kumimaista massaa, ja siten aktiivisuudet on mitattava kuidusta ilman konsentroitintia. Koska tsymogrammitekniikka on esim. kuvan 21 a perusteella melko herkkä, ja se mahdollistaa proteiinin konsentroinnin ennen erottelua, voisi halutessaan jatkokutkimuksena yrittää osoittaa eritetyt aktiivisuudet sen avulla.

Jos haluttaisiin kehittää elintarvike perustuen tällaisen kauran ravintokuitupreparaatin fermentointiin jollain mikrobilla, niin mikäli tuotteessa tulisi olla korkea viskositeetti ja esim. pektiiniä ei haluttaisi jälkikäteen lisätä viskositeetin aikaansaamiseksi, ei mikrobi saisi erittää mitään glykosyylihydrolaasia. Proteaasin vaikutus olisi vähäinen tai olematon. Koska mikrobin täytyisi kuitenkin fermentoida ja kasvaa jollain hiilenlähteellä, niin näin köyhä preparaatti kuin SOF ei sovellu hyvin vaan siihen täytyisi lisätä jotain muuta, tai käyttää enemmän mono- ja disakkarideja sisältävää valmistetta.

## Eri polysakkaridien ja siten eri glykosyylihydrolaasien välinen synergia viskositeetin suhteen jäi epäselväksi

Eräs kysymys on, onko polysakkarideilla jotain vuorovaikutuksia, siis esim. sitoutuvatko tai takertuvatko ne toisiinsa. Kim & White (2012) koittivat selvittää myös tätä kokeissaan, mutta eivät löytäneet todisteita vuorovaikutuksista. Kun tässä työssä kaurakuitupreparaattia käsiteltiin sekä  $\alpha$ -amylaasilla, että endo- $\beta$ -1,4-glukanaasilla niin viskositeetin alenemat olivat suuremmat kuin jos käytettiin vain jompaa kumpaa entsyymeistä (taulukot 5 ja 9, sekä kuvat 23 ja 25). Näin tulee olla siinäkin tapauksessa, että molekyylien välillä ei ole mitään interaktioita. Jos mitään vuorovaikutuksia ei ole, niin esim. puhtaan tärkkelyksen aiheuttaman viskositeetin ja puhtaan  $\beta$ -glukaanin viskositeetin perusteella voisi kuvitella olevan laskettavissa niitä molempia sisältävän liuoksen viskositeetin. Kirjallisuudesta ei ole löydetty kaavaa jolla kahden polysakkaridin seoksen viskositeetin voisi laskea puhtaiden polysakkaridien viskositeettien avulla. Eri viskositeetin omaavien aineiden seoksen viskositeetin laskemista kuitenkin harjoitetaan mm. voiteluöljyjen valmistuksessa (Zhmud 2014). Zhmud (2014) mukaan tähän on olemassa useita yhtälöitä mm. Refutaksen, Kendall-Monroen yhtälöt. Yhteistä näille on se, että komponenttien viskositeeteille tehdään jokin matemaattinen transformaatio. Kendall-Monroen yhtälössä niistä otetaan kuutiojuuri, ja muissa logaritmi. Yritettiin käyttää Zhmud (2014) mukaisia Refutaksen, Kendall-Monroen yhtälöitä, mutta millään näillä ei saatu tuloksia jotka olisivat lähellä mitattua. Zhmud (2014) artikkelissa olevan datan perusteella em. yhtälöt toimivat viskositeeteilla esim. 1 - 4250 mPas välillä, eli ei ole kyse esim. siitä, että hiilivetyjen viskositeetit olisivat niin paljon pienempiä, että nämä yhtälöt eivät pitäisi kaurakuitukokeiden viskositeettialueella. Yksi mahdollinen selitys voisi olla, että nämä on kehitetty tilanteisiin, joissa yhteen liuottimeen sekoitetaan toinen liuotin, kun taas kaurakuituvellin tapauksessa liuottimessa on makromolekyylejä. Tämän työn viskositeettituloksissa mikään yksinkertainen yhteen- ja/tai vähennyslasku ei anna yksittäisillä entsyymeillä käsitellyistä niillä molemmilla käsitelyjen viskositeettia. Kolmannen kokeen viskositeettituloksissa havaittiin eräs riippuvuus  $\alpha$ -amylaasilla ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasilla yhdessä ja erikseen entsyymikäsitelyjen välillä joka edellytti viskositeettien logaritmoimista, mutta saatu yhtälö ei pätenyt muiden kokeiden tuloksiin, joten se ei voinut pitää paikkansa. Siten ei löydetty keinoa laskea  $\alpha$ -amylaasin ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasin erikseen aiheuttamien viskositeetin alenemien avulla niiden yhdessä aiheuttamaa viskositeetin alenemaa. Tämä saattaa tarkoittaa sitä, että näiden polysakkaridien välillä olisi jotain interaktioita, mutta ei todista sitä, eli tämä asia jää edelleen epäselväksi. Jos  $\beta$ -glukaani estää tärkkelyksen retrogradaatiota, kuten edellä esitettiin, niin se saattaa olla interaktio, josta ei seuraa vaikutuksia viskositeettiin. Kim & White (2012)

saamien tulosten mukaan synergiaa ja interaktioita viskositeetissa ei ole, ja kun tässä työssä ei saatu selvää tulosta puolesta tai vastaan, niin ehkäpä paras on hyväksyä heidän tuloksensa, että tärkkelyksen ja  $\beta$ -glukaanin välillä ei ole interaktioita jotka kasvattavat niiden viskositeettia suuremmaksi kuin mitä niillä on erikseen.

## Johtopäätökset

Keitetyn kaurakuitupreparaatin viskositeettia alentavat eniten  $\alpha$ -amylaasi ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi. Proteaasi ei vaikuta kaurakuitupreparaatin viskositeettiin, kun kuitupreparaatti on keitetty. Endo- $\beta$ -1,4-glukanaasi alentaa viskositeettia yhtä hyvin kuin  $\beta$ -1,3-1,4-glukanaasi. Synergiaa viskositeetin alentamisessa  $\alpha$ -amylaasilla ja endo- $\beta$ -1,4-glukanaasilla ei havaittu. Hyvin pienetkin entsyymiaktiivisuudet vaikuttavat viskositeettiin. Jos esim. kauramaidon valmistuksessa käytetään jotain entsyymivalmisteita, ja halutaan  $\beta$ -glukaanin viskositeetin ja siten terveystuotteiden säilyvän, täytyy entsyymivalmisteiden olla  $\beta$ -glukanaaseista hyvin puhtaita.

Tämän työn tulosten mukaan, mikrobifermentaatioissa tapahtuvat viskositeetin alenemat johtuvat lähinnä mikrobien erittämistä glykosyylhydrolaaseista, ei niinkään esim. metabolian sivutuotteista.

*Exiguobacterium* sp. RB3  $\alpha$ -amylaasi on rakenteeltaan *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylaasin kaltainen glykosyylhydrolaasiryhmän 13 entsyymi. Se sitoo rakenteeseensa kolme kalsiumiatomia, ja kalsiumpitoisuus vaikuttaa sen aktiivisuuteen. Se on aktiivisimmillaan pH alueella 5,0 – 7,5. Se sietää detergenttejä, toisin kuin Chang ym. (2013) karakterisoima *Exiguobacterium*- $\alpha$ -amylaasi, mutta ei sovellu pesuainesovelluksiin koska se ei ole aktiivinen korkeassa pH:ssa. RB3  $\alpha$ -amylaasin turnover number saattaa olla korkea. *Exiguobacterium*-suvun psykrofiilisessä haarassa esiintyy kahta eri  $\alpha$ -amylaasia, joista yksi on tässä karakterisoitu, ja toinen on selvästi erilainen rakenteeltaan ja biokemiallisilta ominaisuuksiltaan.

## Kiitokset

Kiitokset tämän työn ohjaajille Matti Korholalle ja Suvi Tairalle neuvoista, kannustuksesta ja erityisesti kärsivällisyydestä. Kiitokset myös YMBO:n henkilökunnalle mm. Saana Haarmalle, ja vastuuprofessoreille Benita Westerlund-Wikströmille ja Sarah Butcherille, jotka ovat antaneet mahdollisuuden tehdä tätä työtä YMBO:lla. Kiitos Ari Partille siitä, että on osoittanut kiinnostusta kyselemällä työn edistymisen perään.

## Viitteet

Altschul, S. F., Warren, G., Webb, M., Meyers, E. W., Lipman D. J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410

Arth, A., Kancherla, V., Pachón, H., Zimmerman, S., Johnson Q., Oakley, G.P. 2016. A 2015 global update on folic acid-preventable spina bifida and anencephaly. *Birth Defects Research (Part A)* 106:520–529

Bell, K. N., Oakley, G. P. Jr. 2009. Update on Prevention of Folic Acid-Preventable Spina Bifida and Anencephaly. *Birth Defects Research (Part A)* 85:102-107

- Beer, M. U., Wood, P. J., Weisz, J. 1997. Molecular Weight Distribution and (1->3)(1->4)-b-D-Glucan Content of Consecutive Extracts of Various Oat and Barley Cultivars. *Cereal Chemistry* 74:476-480
- Bessler, C., Schmitt, J., Maurer, K.-H., Schmid, R. 2003. Directed evolution of a bacterial  $\alpha$ -amylase: Toward enhanced pH-performance and higher specific activity. *Protein Science* 12:2141-2149
- Bozonnet, S., Jensen, M. T., Nielsen, M. M., Aghajari, N., Jensen, M. H., Kramhøft, Willemoës, M., Tranier, S., Haser, R., Svensson, B. 2007. The 'pair of sugar tongs' site on the non-catalytic domain C of barley  $\alpha$ -amylase participates in substrate binding and activity. *The FEBS Journal* 274:5055-5067.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254
- Brzozowski, A.M., Davies, G.J. 1997. Structure of the *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -Amylase Complexed with the Inhibitor Acarbose at 2.0 Å Resolution. *Biochemistry* 36:10837-10845
- Cazy.org sivuston GH5 sivu. <http://www.cazy.org/GH5.html> Viitattu 27.4.2018
- Cazy.org sivuston GH57 sivu. <http://www.cazy.org/GH57.html> Viitattu 27.4.2018
- Cazy.org sivuston GH70 sivu. <http://www.cazy.org/GH70.html> Viitattu 27.4.2018
- Chang, J., Lee, Y., Fang, S., Park, I., Choi, Y. 2013. Recombinant Expression and Characterization of an Organic-Solvent-Tolerant  $\alpha$ -Amylase from *Exiguobacterium* sp. DAU5. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169:1870-1883
- Collins, M. D., Lund, B.M., Farrow, J.A.E., Schleifer, K.H. 1983. Chemotaxonomic study of an Alkalophilic Bacterium, *Exiguobacterium aurantiacum* gen. nov. sp. nov. *Journal of General Microbiology* 129:2037-2042
- Dahiya, R. S., Speck, M. L. Hydrogen Peroxide Formation by Lactobacilli and Its Effect on *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Science* 51:1568-1571
- Davies, G., Henrissat, B. 1995. Structures and Mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 15:853-859
- Dhital, S., Dolan G., Stokes, J. R., Gidley, M. J. 2014. Enzymatic hydrolysis of starch in the presence of cereal soluble fibre polysaccharides. *Food & Function* 5:579-586
- Enampour, M., Noghabi, K.A., Zahiri, H.S. 2015. Molecular cloning and biochemical characterization of a novel cold-adapted alpha-amylase with multiple extremozyme characteristics. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 111:79-86
- EP 1637596 B1. 2011. Alkaline bacillus amylase. Novozymes A/S, Bagsvaerd, Tanska. (Outtrup, H., Bisgård-Frantzen, H., Østergaard, P.R., Rasmussen, M.D., Van der Zee, P.). 05020499.9, 29.03.1995, Julkaistu 18.05.2011. 38 s. (haettu sivustolta: [https://www.lens.org/lens/patent/EP\\_1637596\\_B1](https://www.lens.org/lens/patent/EP_1637596_B1) viitattu 8.3.2018)
- Feiroke, H.-P., Bagnara-Tardif, C., Gaudin, C., Guerlesquin, F., Sauve, P., Belaich, A., Belaich J.-P. 1993. Purification and characterization of endoglucanase C from *Clostridium cellulolyticum*. *Eur J. Biochem* 217:557-565

- Fernandes, V.O., Costa, M., Ribeiro, T., Serrano, L., Cardoso, V., Santos, H., Lordelo, M., Ferreira, L.M.A., Fontes, C.M.G.A. 2016. 1,3-1,4- $\beta$ -Glucanases and not 1,4- $\beta$ -glucanases improve the nutritive value of barley-based diets for broilers. *Animal Feed Science and Technology* 211:153-163
- Frank, J., Sundberg, B., Kamal-Eldin, A., Vessby, B., Åman, P. 2004. Yeast-Leavened Oat Breads with High or Low Molecular Weight  $\beta$ -Glucan Do Not Differ in Their Effects on Blood Concentrations of Lipids, Insulin, or Glucose in Humans. *The Journal of Nutrition*. 134:1384–1388
- Fujimoto, Z., Takase, K., Doui, N., Momma, M., Matsumoto, T., Mizuno, H. 1998. Crystal Structure of a Catalytic-site Mutant  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus subtilis* Complexed with Maltopentaose. *J. Mol. Biol.* 277:393-407
- Foerster J, Maskarinec G, Reichardt N, Tett A, Narbad A, et al. 2014. The Influence of Whole Grain Products and Red Meat on Intestinal Microbiota Composition in Normal Weight Adults: A Randomized Crossover Intervention Trial. *PLoS ONE* 9(10): e109606.
- Hahn, M., Olsen, O., Politz, O., Borriss, R., Heinemann, U. 1995. Crystal Structure and Site-directed mutagenesis of *Bacillus macerans* Endo-1,3-1,4- $\beta$ -glucanase. *Journal of Biological Chemistry* 270:3081-3088
- Hautala, M. 2004. Fysiikkaa pellostä pöytään ja takaisin peltoon. *Maa-, ja kotitalousteknologian laitoksen julkaisuja 16, Helsingin yliopisto*. Yliopistopaino 2004
- Henrissat, B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280:309-316
- Herranen, M., Kariluoto, S., Edelmann, M., Piironen, V., Ahvenniemi, K., Iivonen, V., Salovaara, H., Korhola, M. 2010. Isolation and characterization of folate-producing bacteria from oat bran and rye flakes. *International Journal of Food Microbiology*. 142:277-285
- HY:n TUHAT-sivusto Folafibre-projektistä: [https://tuhat.helsinki.fi/portal/en/projects/folafibreaqueous-pr\(a764e0fc-5f3c-4929-9ec7-22489e790448\).html](https://tuhat.helsinki.fi/portal/en/projects/folafibreaqueous-pr(a764e0fc-5f3c-4929-9ec7-22489e790448).html) Viitattu 25.4.2018
- Härkönen, H., Lehtinen, P., Suortti, T., Parkkonen, T., Siika-aho, M., Poutanen, K. 1995. Effects of a Xylanase and a beta-Glucanase on Whole Meal Rye Slurry. *Journal of Cereal Science* 21:173-183
- Höije, A., Gröndahl, M., Tomeeraas, K., Gatenholm, P. 2005. Isolation and characterization of physicochemical and material properties of arabinoxylans from barley husks. *Carbohydrate Polymers* 61:266-275
- Kariluoto, S., Edelmann, M., Herranen, M., Lampi, A.-M., Shmelev, A., Salovaara, H., Korhola, M., Piironen, V. 2010. Production of folate by bacteria isolated from oat bran. *International Journal of Food Microbiology* 143:41-47.
- Kariluoto, S., Edelmann, M., Nyström, L., Sontag-Strohm, T., Salovaara, H., Kivelä, R., Herranen, M., Korhola, M., Piironen, V. 2014. In situ enrichment of folate by microorganisms in beta-glucan rich oat and barley matrices. *International Journal of Food Microbiology* 176:38-48

- Kasana, R.C., Pandey, C.B. 2018. *Exiguobacterium*: an overview of a versatile genus with potential in industry and agriculture. *Critical reviews in biotechnology* 38:141-156
- Katoh, K., Standley, D. M. 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7. Improvements in Performance and Usability. *Mol. Biol. Evol.* 30(4):772–780
- Kim, H. J., White, P. J. 2012. Interactional Effects of  $\beta$ -Glucan, Starch, and Protein in Heated Oat Slurries on Viscosity and In Vitro Bile Acid Binding. *Journal of Agricultural and food chemistry* 60:6217-6222
- Kivelä, R., Nyström, L., Salovaara, H., Sontag-Strohm, T. 2009. Role of oxidative cleavage and acid hydrolysis of oat beta-glucan in modelled beverage conditions. *Journal of Cereal Science* 50:190–197
- Kuriyan, J., Konforti, B., Wemmer, D. 2013. *The Molecules of Life: Physical and Chemical Principles*. Garland Science
- Korhola, M., Hakonen, R., Juuti, K., Edelmann, M., Kariluoto, S., Nyström, L., Sontag-Strohm, T., Piironen, V. 2014. Production of folate in oat bran fermentation by yeasts isolated from barley and diverse foods *Journal of Applied Microbiology* 117:679-689.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23:2947-2948.
- Lazaridou, A., Biliaderis, C. G. 2007. Molecular aspects of cereal  $\beta$ -glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. *Journal of Cereal Science* 46:101-118
- Li, W., Cui, S., Wang, Q., Yada, R. 2012. Study of conformational properties of cereal  $\beta$ -glucans by computer modeling. *Food Hydrocolloids* 26:377-382.
- Lia, Å., Hallmans, G., Sandberg, A.-S., Sundberg, B., Åman, P., Andersson, H. 1995. Oat  $\beta$ -glucan increases bile acid excretion and a fiber-rich barley fraction increases cholesterol excretion in ileostomy subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 62:1245-51.
- Liu, Y. 2010. Beta-glucan effects on pasting properties and potential health benefits of flours from different oat lines. *Graduate Theses and Dissertations* (Iowa State University). <http://lib.dr.iastate.edu/etd/11303/>. Viitattu 4.2.2016.
- Machius, M., Declerck, N., Huber, R., Wiegand, G. 1998. Activation of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase through a disorder-order transition of the substrate-binding site mediated by a calcium–sodium–calcium metal triad. *Structure* 6:281-292
- Machovic, M., Janecek, S. 2003. The invariant residues in the  $\alpha$ -amylase family: just the catalytic triad. *Biologia* 58:1127-1132

- Mathlouthi, N., Saulnier, L., Quemener, B., Larbier, M. 2002. Xylanase, beta-Glucanase and Other Side Enzymatic Activities Have Greater Effects on the Viscosity of Several Feedstuffs than Xylanase and beta-Glucanase Used Alone or in combination. *J. Agric. Food Chem.* 50:5121-5127
- Mawadza, C., Hatti-Kaul, R., Zvauya, R., Mattiasson, B. 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *Journal of Biotechnology* 83:177-187
- Mehta, D., Satyanarayana, T. 2014. Domain C of thermostable  $\alpha$ -amylase of *Geobacillus thermoleovorans* mediates raw starch adsorption. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:4503-4519
- McKeown, N., Meigs, J., Liu, S., Wilson, P., Jacques, P. 2002. Whole-grain intake is favorably associated with metabolic risk factors for type 2 diabetes and cardiovascular disease in the Framingham Offspring Study. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 76:390-398
- Mojallali, L., Zahiri, H. S., Rajaei, S., Noghabi, K. A., Haghbeen, K. A novel  $\alpha$ -amylase from psychrotroph *Exiguobacterium* sp. SH3: Production purification and characterisation. *Biotechnology and applied biochemistry* 61:118-125
- Mäkinen, O., Kivelä, R., Nyström, L., Andersen, M. L. Sontag-Strohm, T. 2012. Formation of oxidising species and their role in the viscosity loss of cereal beta-glucan extracts. *Food Chemistry* 132:2007-2013
- Mäntsälä, P., Zalkin, H. 1979. Membrane-bound and Soluble Extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry.* 254:8540-8547.
- Nagano, N., Porter, C. T., Thornton, J. M. 2001. the beta/alpha8 glycosidases: sequence and structure analyses suggest distant evolutionary relationships. *Protein Engineering* 14:11 845-855.
- Nielsen, J. E., Borchert, T. V., Vriend G. 2001. The determinanats of  $\alpha$ -amylase pH-actovoty profiles. *Protein engineering* 14:505-512
- NEBcuttter V2.0: New England Biolabsin internet-sivusto: <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/> Viitattu 8.3.2018
- Novozymesin internet sivusto, Forest, Starch modification. <https://www.novozymes.com/en/advance-your-business/forest> Viitattu 16.5.2018
- Novozymesin internet sivusto, Denim Abrasion (Denimax) <https://www.novozymes.com/en/advance-your-business/textiles> Viitattu 16.5.2018
- Novozymesin patentti no EP 1637596 B1,
- Ragae, S. M., Campbell, G. L., Scoles, G. J., McLeod, J. G., Tyler, R. T. 2001. Studies on Rye (*Secale cereale* L.) Lines Exhibiting a Range of Extract Viscosities. 1. Composition, Molecular Weight Distribution of Water Extracts, and Biochemical Characteristics of Purified Water-Extractable Arabinoxylan. *J. Agric. Food Chem.* 49:2437-2445

- Rivera, M. H., López-Munguía, A., Soberón, X., Saab-Rincón, G. 2003.  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus licheniformis* mutants near to the catalytic site: effects on hydrolytic and transglycosylation activity. *Protein Engineering* 16:505-514
- Rodrigues, D. T., Goris, J., Vishnivetskaya, T., Gilichinsky, D., Thomasov, M. F., Tiedje, J. M. 2006. Characterization of *Exiguobacterium* isolates from the Siberian permafrost. Description of *Exiguobacterium sibiricum* sp. nov. *Extremophiles* 10:285-294.
- Salmenkallio-Marttila, M., Katina, K., Autio, K. 2001. Effects of Bran Fermentation on Quality and Microstructure of High-Fiber Wheat Bread. *Cereal Chem.* 78(4):429-435
- Sambrook, J., Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning – a Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA
- Santos, C. R., ym. 2012. Dissecting structure–function–stability relationships of a thermostable GH5-CBM3 cellulase from *Bacillus subtilis* 168. *Biochemical Journal* 441:95-104
- Sarbu, A., Goncalves, F., de Pinho, M. N. 2003. Oat spelt xylan molecular mass estimation by size exclusion chromatography. *Carbohydrate Polymers* 53:297-304
- Sarian F.D., Janeček, S., Pijning, T., Ihsanawati, Nurachman, Z., Radjasa, O.K., Dijkhuizen, L., Natalia, D., van der Maarel, M.J.E.C. 2017. A new group of glycoside hydrolase family 13  $\alpha$ -amylases with an aberrant catalytic triad. *Scientific reports* 7:44230
- Sibakov, J. 2014. Processing of oat dietary fibre for improved functionality as a food ingredient. *VTT*
- Sinogh, A. K., Hertzberger, R. Y., Knaus U. G. 2018. Hydrogen peroxide production by lactobacilli promotes epithelial restitution during colitis. *Redox Biology* 16:11-20
- Shirai, T., Igarashi, K., Ozawa, T., Hagihara, H., Kobayashi, T., Ozaki, K., Ito, S. 2007. Ancestral Sequence Evolutionary Trace and Crystal Structure Analyses of Alkaline  $\alpha$ -Amylase From *Bacillus* sp. KSM-1378 to Clarify the Alkaline Adaptation Process of Proteins. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* 66:600-610
- Song, Y., DiMaio, F., Wang, R.Y., Kim, D., Miles, C., Brunette, T.J. Thompson, J., Baker, D. 2013. High-Resolution Comparative Modeling with RosettaCM. *Structure* 21:1735-1742
- Stam, M.R., Danchin, E.G.J., Rancurel, C., Coutinho P.M., Henrissat, B. 2006. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of  $\alpha$ -amylase-related proteins. *Protein engineering, design & selection* 19:555-562
- Suvd, D., Fujimoto, Takase, K., Matsumura, M., Mizuno, H. 2001. Crystal Structure of *Bacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -Amylase: Possible Factors Determining the Thermostability. *J. Biochem.* 129:461-468
- Takase, K. 1993. Effect of mutation of an amino acid residue near the catalytic site on the activity of *Bacillus stearothermophilus* alfa-amylase. *Eur. J. Biochem.* 211:899-902



Tester, R. F., Karkalas, J. 2002. luku 13, Starch. Kirjassa: Biopolymers 6, Polysaccharides II, De Baets, S., Vandamme, E. J., Steinbüchel, A. (toim.). 2002. Wiley-Vch.

US 20130059031. 2013. Use of an anti-staling enzyme mixture in the preparation baked bread. CSM Nederland B.V. Hollanti. (Else, A.J., Tronsmo, K.M., Niemann, L.-A., Moonen, J.H.E.) US 13/593317, 23.8.2012. Julkaistu 7.3.2013. 5 s.

Vishnivetskaya, T. A., Kathariou, S., Tiedje, J. M. 2009. The *Exiguobacterium* genus: biodiversity and biogeography. *Extremophiles* 13:541-555

Voet, D., Voet, J. G. 2004. Biochemistry, 3<sup>rd</sup> edition. John Wiley & Sons Inc. USA

Wagner, H. L. 1985. The Mark-Houwink-Sakurada Equation for the Viscosity of Linear Polyethylene. *J. Phys Chem. Ref. Data* 14:611-617

Wang, Q., Ellis, P. R. 2014. Oat  $\beta$ -glucan: physico-chemical characteristics in relation to its blood-glucose and cholesterol-lowering properties. *British Journal of Nutrition* 112:S4–S13

Wood, P. J., Weisz, J., Blackwell, B. A. 1991. Molecular Characterization of Cereal  $\beta$ -D-Glucans. Structural Analysis of Oat  $\beta$ -D-Glucan and Rapid Structural Evaluation of  $\beta$ -D-Glucans from Different Sources by High-Performance Liquid Chromatography of Oligosaccharides Released by Lichenase. *Cereal Chem.* 68(1):31-39.

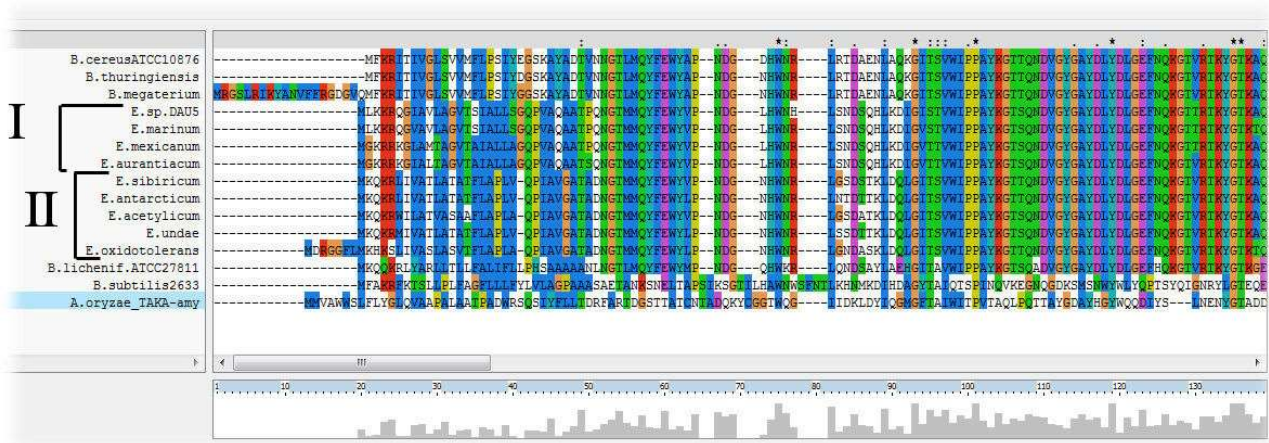
Yao, N., Jannink, J. J., White, P. J. 2007. Molecular Weight Distribution of (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -Glucan Affects Pasting Properties of Flour from Oat Lines with High and Typical Amounts of  $\beta$ -Glucan. *Cereal Chemistry* 84(5):471–479

Yle uutisten verkkosivut. Kaura on nyt pop – siihen siirtyvät sekä trendikkäät kuluttajat että viljelijät. <https://yle.fi/uutiset/3-10152767> (Julkaistu 10.4.2018). Viitattu 25.4.2018

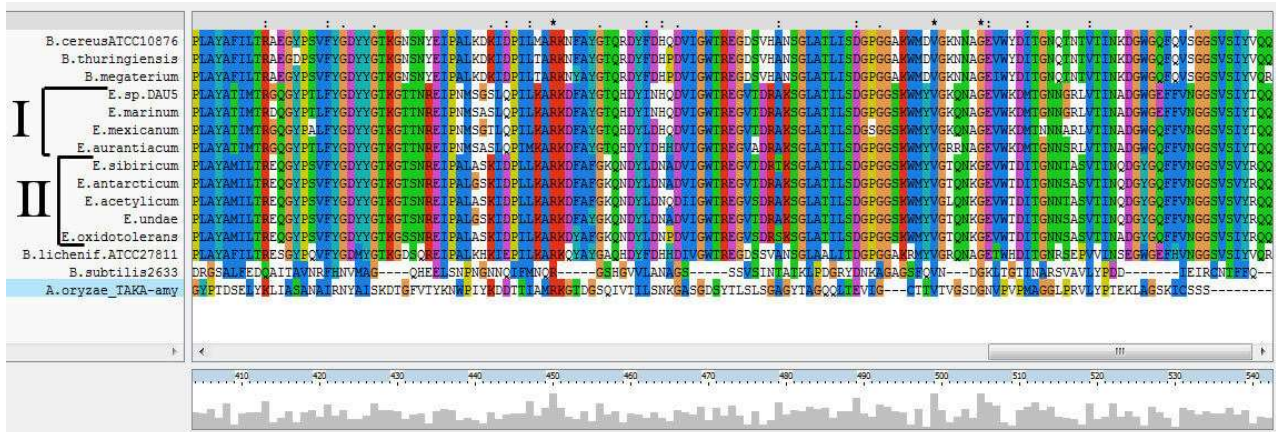
Zhmud, B. 2014. Viscosity Blending Equations. *Lube magazine* 121:24-29

Zhou, M., Robards, K., Glennie-Holmes, M., Helliwell, S. 2000. Effects of enzyme treatment and processing on pasting and thermal properties of oats. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:1486-1494

# Liite 1 $\alpha$ -amylaasigeenialukkeiden suunnittelun linjaukset



Linjaukset otettiin proteiini- ja nukleotidisekvenssien avulla N-terminaalisen pää-alueen suunnittelusta. *Exiguobacterium*  $\alpha$ -amylaasien sekvenssien ryhmät I ja II merkitty kuvaan.



Linjaukset otettiin proteiini- ja nukleotidisekvenssien avulla C-terminaalisen pää-alueen suunnittelusta. *Exiguobacterium*  $\alpha$ -amylaasien sekvenssien ryhmät I ja II merkitty kuvaan.

# Liite 2 RB3 $\alpha$ -amylaasin nukleotidisekvenssi

Huom.: ei sisällä erityssignaali-peptidiä koodaavaa sekvenssiä. Pienellä kirjoitetut ovat sekvenssit PCR-alueiden kohdalta, isolla kirjoitettu niiden väliltä. Alukesekvenssien poistaminen olisi johtanut lyhentyneeseen proteiiniin.

>*Exiguobacterium*\_RB3\_amy

```

aacggtacgatgatgcaatattttgaatggTATGTGCCAATGACGGTAATCAC
TGAACCGTCTCGGGAGTGATGCAACAAAGCTCGATCAGCTCGGAATCACATCGGTCTGG
ATTCCCCCTGCTTACAAAGGTACCTCGCAAAATGATGTCGGATACGGCGCCTATGATTTG
TACGATTTAGGTGAGTTCAACCAAAAAGGAACGGTCCGTACGAAATACGGCACAAAGCGG
    
```

CAATTAAAAACGGCGATCGGACAATTGCATACCGCCGGAATCGATGTCTATGGCGATGTC  
GTCATGAACCATAAAGGTGGCGCCGATTTACGGAAGCCGTACGGCAGTCGAAGTCAAT  
CCGGGTAACCGTAATCAAGAAGTCTCTGGCGATTATCAAATCCAGGCATGGACGGGCTTC  
AATTTTGCAGCGCGAAATAACCTCTACTCGAACTTCAAGTGGAAATGGTACCACTTCGAC  
GGCACGGACTGGGATCAATCGCGTTCAAAAAGCGCCATCTACAAGTTCCGCGGTACTGGT  
AAAGCGTGGGATACGGATGTCTCAGGTGAAAATGGCAACTACGATTACTTGATGTATGCG  
GATCTCGACTTCGATCATCCAGAAGTCCAGCAAGAAATGAAGAAGTGGGGTAAATGGTAC  
GTCAACGAACTTGGTCTTGATGGGTTCCGTCTCGATGCCGTCAAGCATATCAAACACGGT  
TACTTAGCGGACTGGCTCGCGAACGTTCTGTCAGACGACGGGCAAACCATTTGTTTACAGTC  
GCAGAGTACTGGCAGAACGATCTCGGCACGTTGCAAACTACTTAAGTCGGACGAATTAT  
CAACAATCCGTTTTTGGATGCACCGCTTCATTATAAGTTCGAACAGGCAAGTAAAGGCGGC  
GGGTACTATGACATGCGGACGATCTTTGACGGTACTCTCGTCAAGAGCAATCCAGCCCAA  
GCCGTCACTCGTAGAGAACCATGATTTCGCAGCCTGGACAATCGCTTGAATCAACGGTT  
CAGTCATGGTTCAAACCACTTGCTTACGCGATGATTCTGACACGTGAACAAGGCTATCCG  
TCGGTCTTCTATGGTGACTACTATGGTACAAAGGGTACGTGCAATCGCGAAATTCCAGCA  
CTCGCTTCGAAAATTGATCCGTTACTTAAAGCACGTAAGGACTTCGCATTCGGGAAACAA  
AATGATTACCTCGATAACCAAGACATCATCGGTTGGACACGTGAAGGTGTCTCAGACCGT  
GCGAAATCAGGTCTTGCGACGATTCTGTCAGATGGTCCTGGCGGTAGCAAGTGGATGTAC  
GTCGGGCTTCAGAACAAAGGAGAAGTTTGGACAGACATCACTGGAAACAACACGAAGTCG  
GTCACGATCAATCAAGATGGCTACGGTCAATTCTTCGTCAATGGTGGTTCGGTTTCCGTA  
taccgccagcagtaa

## Liite 3 digitaalisena säilytettävän tiedon tiedostonimet

Amylaasin aminohapposekvenssien linjaus: linjaus 5.3 MAFFT output.fasta

*Exiguobacterium* sp. RB3 amylaasin rakennemallit: RB3\_model1.pdb, RB3\_model2.pdb, RB3\_model3.pdb, RB3\_model4.pdb, RB3\_model5.pdb

*Exiguobacterium* sp. DAU5 amylaasin rakennemallit: DAU5\_Model1.pdb, ..., DAU5\_Model5.pdb

*Exiguobacterium* sp. SH3 amylaasin rakennemallit: SH3amy\_model1.pdb, ..., SH3amy\_model5.pdb

PyMol session -tiedosto, jossa on johdannon amylaasit (kuvat 6 ja 7), sekä niiden 3D-vertailut *Exiguobacterium* amylaaseihin, ja niiden väliset vertailut: RB3, DAU5, SH3 ja Bacillus amylaasit.pse

PyMol session -tiedosto, jossa B-domeenin Ca- ja Na-sitomiskohdat ilman korjauksia (kuva 33): Amylaasit, B.lich ja RB3 Ca<sup>2+</sup> sitomiskohdat.pse

PyMol session -tiedosto, jossa B-domeenin Ca- ja Na-sitomiskohdat korjailtu (kuva 34): Amylaasit, B.lich ja RB3 Ca<sup>2+</sup> sitomiskohdat B-dom rotameerit mut.pse

PyMol session -tiedosto, jossa A ja C-domeenien välinen Ca-sitomiskohdat korjailtu (ja B-dom. samat) (kuva 35): Amylaasit, B.lich ja RB3 Ca<sup>2+</sup> sitomiskohdat A-C-dom rotameerit mut.pse