



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 301 174**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/80 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **97901640 .9**
(86) Fecha de presentación : **24.01.1997**
(87) Número de publicación de la solicitud: **0876494**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **11.11.1998**

(54) Título: **Producción y secreción de xilanasas de actinomicetes en un hongo filamentoso de *Trichoderma*.**

(30) Prioridad: **26.01.1996 US 590563**

(73) Titular/es: **AB Enzymes GmbH**
Feldbergstrasse 78
64293 Darmstadt, DE

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

(72) Inventor/es: **Mäntylä, Arja;**
Paloheimo, Marja;
Lantto, Raija;
Fagerström, Richard;
Lahtinen, Tarja;
Suominen, Pirkko y
Vehmaanperä, Jari

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 301 174 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Producción y secreción de xilanasas de actinomicetes en un hongo filamentoso de *Trichoderma*.

5 La presente invención proporciona vectores de expresión recombinante para producir xilanasas de actinomicetes en hongos filamentosos *Trichoderma*, transformando dichos huéspedes fúngicos filamentosos con un vector de expresión que contiene una secuencia de ADN que codifica uno o más dominios funcionales de una proteína fúngica secretable, en la que el dominio funcional es un dominio de cola de una celulasa fúngica secretable o un dominio central y de bisagra de una mananasa fúngica secretable derivada del huésped *Trichoderma*. También se proporcionan huéspedes transformados con dichos vectores de expresión. Dichos huéspedes transformados producen preparaciones de xilanasas útiles, por ejemplo, para modificar las propiedades de la biomasa vegetal, especialmente para reducir el contenido de lignina en blanqueado asistido con enzimas.

15 El objetivo del blanqueado de pulpa de papel kraft es retirar la lignina residual que queda en la pulpa después del cocido del papel kraft. Tradicionalmente, esto se ha hecho usando compuestos químicos que contienen cloro. Debido a los problemas medioambientales y las demandas del consumidor, se han deseado tecnologías de blanqueado alternativas.

20 El primer enfoque biotécnico para este problema fue atacar la lignina directamente con enzimas que degradan la lignina. Sin embargo, la química de la degradación enzimática de la lignina parece ser muy complicada y difícil de controlar.

25 La lignina puede degradarse, si se usa el microorganismo completo que produce enzimas ligninolíticas. Sin embargo, los tiempos de tratamiento son relativamente largos. Por ejemplo, los tiempos de tratamiento pueden llevar días, y los microorganismos necesitan nutrientes suplementarios para que funcionen. También puede ser difícil controlar el crecimiento de otros microbios indeseados. El uso de la degradación de lignina por enzimas ligninolíticas aisladas o por microorganismos es objeto de mucha investigación (véase, por ejemplo, Farrell, R.L. y col., *Lignocellulosics* 305-315 (1992); Jurasek, L., *Lignocellulosics* 317-325 (1992)).

30 Además de celulosa y lignina, la pulpa de madera contiene hemicelulosa. Otro enfoque para reducir el contenido de lignina de la pulpa es atacar la hemicelulosa - el tercer componente principal de la madera. La hemicelulosa en madera noble nativa es principalmente xilano, mientras que en madera blanda la hemicelulosa es principalmente glucomananos y algún xilano. Durante el cocido del papel kraft, parte del xilano se disuelve en el agua de cocido. Hacia el final del periodo de cocido, cuando la concentración de álcali disminuye, parte del xilano disuelto y modificado precipita de nuevo sobre la fibra de celulosa.

35 En 1986, se observó que el pretratamiento con xilanasas de pulpa de papel kraft provoca una necesidad disminuida de compuestos químicos en el proceso de blanqueado (Viikari, L. y col. *Proceedings of the 3rd Int. Conf. on Biotechnology in the Pulp Paper Ind.*, Stockholm (1986), pág. 67-69). El pretratamiento con xilanasas de la pulpa de papel kraft hidroliza parcialmente el xilano en pulpa de papel kraft. El mecanismo de cómo la hidrólisis de xilano provoca una mejor retirada de la lignina no está completamente entendido. Una posibilidad frecuentemente sugerida es que la estructura de la pulpa llega a ser más porosa y esto posibilita una retirada más eficaz de los fragmentos de lignina en las posteriores fases de blanqueado y extracción. También la hidrólisis del xilano localizado en las partes internas de la fibra y posiblemente unidas a la lignina puede tener una tarea. Después, en varios laboratorios, se informó de que el pretratamiento con xilanasas era útil junto con secuencias de blanqueado que constan de Cl₂, ClO₂, H₂O₂, O₂ y O₃. Véanse las revisiones en Viikari, L. y col., *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 335-350 (1994); Viikari, L. y col., en: Saddler, J.N., ed., *Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues*, C-A-B International (1993), pág. 131-182; Grant, R., *Pulp and Paper Int.* (Sept. 1993), pág. 56-57; Senior & Hamilton, J. *Pulp & Paper*: 111-114 (Sept. 1992); Bajpai & Bajpai, *Process Biochem.* 27:319-325 (1992); Onysko, A., *Biotech. Adv.* 11:179-198 (1993); y Viikari, L. y col., *J. Paper y Timber* 73:384-389 (1991).

40 Como resultado directo de la mejor capacidad de blanqueado de la pulpa después de dicho tratamiento con xilanasas, hay una reducción del posterior consumo de compuestos químicos de blanqueado, que cuando se usan compuestos químicos que contienen cloro, conduce a una formación reducida de compuestos de organo-cloro medioambientalmente indeseados. También, como resultado directo de la mejor capacidad de blanqueado de la pulpa después de un tratamiento con xilanasas, es posible producir un producto con un mayor brillo final donde dicho brillo sería de otro modo difícil de conseguir (tal como blanqueado totalmente libre de cloro (TCF) usando peróxido). A causa de la especificidad de sustrato de la enzima xilanasas, las fibras de celulosa no se dañan y las propiedades de resistencia del producto están dentro de los límites aceptables.

45 Una xilanasas que es activa a un pH alcalino disminuiría la necesidad de acidificar la pulpa antes del tratamiento con xilanasas. Además, las temperaturas de muchos procedimientos modernos de cocido y blanqueado de papel kraft son relativamente elevadas, bastante por encima de 50°C que es adecuado para muchas de las enzimas de blanqueado comerciales. Por consiguiente, existe una necesidad de preparaciones de xilanasas termoestables que sean estables a valores de pH alcalino para su uso en procedimientos de blanqueado de pulpa de madera.

50 Se sabe que los actinomicetes, por ejemplo (*Microtetraspora flexuosa* ATCC35864 y *Thermomonospora fusca* KW3), producen xilanasas termoestables y estables a condiciones alcalinas (documentos US 5.437.992 y EP 473

545). Se ha informado de que la clonación de xilanasas a partir de varias bacterias (por ejemplo, Ghangas, G.S. y col., J. Bacteriol. 171:2963-2969 (1989); Lin, L.-L., Thomson, J.A., Mol. Gen. Genet. 228:55-61 (1991); Shareck, F. y col., Gene 107:75-82 (1991); Scheirlinck, T. y col., Appl. Microbiol. Biotechnol. 33:534-541 (1990); Whitehead, T.R., Lee, DA, Curr. Microbiol. 23:15-19 (1991)); y también a partir de *Actinomadura sp.* FC7 (Etier, J.-F. y col., en: Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics, R. Baltz y col., Eds, (Proc. 5th ASM Conf. Gen. Mol. Biol. Indust. Microorg., Oct 11-15, 1992, Bloomington, Indiana, póster C25)). Se ha propuesto por algunos investigadores que el primer género *Actinomadura* debe dividirse en dos géneros, *Actinomadura* y *Microtetrastpora*, incluyendo el último, por ejemplo el anterior *A. flexuosa* (Kroppenstedt y col., System. Appl. Microbiol. 13: 148-160 (1990)).

10 El uso de enzimas que hidrolizan la hemicelulosa en diferentes secuencias de blanqueado se analiza en los documentos WO 89/08738, EP 383 999, WO 91/02791, EP 395 792, EP 386 888, EP 473 545, EP 489 104 y WO 91/05908, WO 95/34662, WO 95/18219, WO 95/27779, WO 95/34662, WO 95/18219, WO 92/04664 y WO 92/03540. El uso de enzimas hemicelulolíticas para la retirada mejorada de agua de la pulpa mecánica se analiza en los documentos EP 262 040, EP 334 739 y EP 351 655, DE 4.000.558, WO 92/04664, WO 92/03540, WO 94/21785 y EP 513 140. Cuando se considera la hidrólisis de la biomasa en combustibles líquidos o compuestos químicos, la conversión tanto de celulosa como de hemicelulosa es esencial para obtener un elevado rendimiento (Viikari y col., "Hemicellulases for Industrial Applications", En: Bioconversion of Forest and Agricultural Wastes, Saddler, J., ed., CAB International, USA (1993)). Además, en la industria alimentaria, hay una necesidad de usar una combinación adecuada de actividades enzimáticas para degradar el sustrato que contiene elevado contenido de β -glucano y hemicelulosa.

20 La producción eficaz y rentable de xilanasas termoestables es un problema, porque las xilanasas termoestables se originan principalmente a partir de bacterias relativamente no estudiadas, que a menudo producen solamente cantidades mínimas o muy pequeñas de xilanasas. Además, hay poca o ninguna experiencia del cultivo de estos microbios en un fermentador o no hay procesos de fermentación disponibles. Además, estos microbios pueden ser inadecuados para producción a escala industrial. Por otro lado, se sabe que los hongos filamentosos como *Aspergillus* y *Trichoderma* producen grandes cantidades de proteínas, en una escala industrial. En particular, estos hongos han demostrado ser adecuados para la producción de proteínas homólogas o heterólogas de origen fúngico.

30 Hay muy pocos informes relacionados con la producción de proteínas o enzimas de origen bacteriano en hongos filamentosos: se ha informado de la producción de endoglucanasa a partir de *Cellulomonas fimi* (Gwynne y col., Bio/Technology 5: 713-719 (1987); y β -glucuronidasa a partir de *E. coli* (Punt y col., J. Biotechnol. 17:19-34 (1991) en *A. nidulans*. De estas enzimas, la endoglucanasa se secretó en el medio de cultivo por *Aspergillus nidulans* en el intervalo de 10-15 mg de proteína por litro, la β -glucuronidasa fue solamente detectable de forma intracelular.

35 Muchos de los estudios sobre la expresión génica heteróloga se han referido a genes de mamíferos (van den Hondel y col., Heterologous gene expression in filamentous fungi, Ed. Bennett y Lasure. More Gene Manipulations in Fungi Academic Press, San Diego, U.S.A., pág. 396-428 (1991); Gouka y col., efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects, Appl. Microbiol. Biotechnol. 47:1-11(1997)). Hasta ahora, los rendimientos iniciales de enzimas eucariotas en hongos filamentosos han estado en un intervalo de decenas de mg por litro en cultivos de matraz en agitación. En la publicación de patente internacional WO 90/15860 se describió la secreción de quimiosina por *A. niger* var. *awamori* usando una fusión al gen homólogo de glucoamilasa. Nyyssönen y col., Bio/Technology 11:591-595 (1993) y Nyyssönen y col., Can. J. Bot. 73 (Supl.1): S885-S890 describen la producción de fragmentos de anticuerpos en *Trichoderma reesei*. El mejor rendimiento de fragmentos de anticuerpos cuando se produjeron como una fusión al gen de la celobiohidrolasa 1 de *T. reesei* estuvo en el intervalo de 40 mg por litro en un cultivo de matraz en agitación.

50 La invención se refiere, entre otros, a vectores de expresión recombinante para producir, es decir, expresar y secretar, xilanasas que se originan a partir de bacterias, especialmente de actinomicetes. El propósito principal de la invención es proporcionar un vector de expresión alternativo para producir xilanasas que se originan a partir de actinomicetes en hongos filamentosos, *Trichoderma*.

Las características de la presente invención son como se exponen en las reivindicaciones.

55 La presente invención se refiere a un vector de expresión recombinante para la producción de proteínas o enzimas bacterianas, especialmente xilanasas de actinomicetes en un huésped fúngico filamentoso *Trichoderma*, más preferiblemente en *T. reesei*. Dicho vector comprende un promotor unido de forma funcional a una secuencia de ADN que codifica uno o más dominios funcionales de una proteína secretable de hongo filamentoso, preferiblemente un dominio de cola de una celulasa o un dominio central y de bisagra de una mananasa derivada de *Trichoderma*, que a su vez abarca la secuencia de ADN, por ejemplo, la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 3, o equivalentes de las mismas, que codifican una proteína bacteriana, preferiblemente una xilanasas de actinomicetes, más preferiblemente xilanasas de 35 kD (AM35) o de 50 kD (AM50) de *Actinomadura flexuosa*, es decir la SEC ID N° 2 o la SEC ID N° 4 o equivalentes de las mismas.

65 También se proporcionan secuencias peptídicas de proteína de 35 kDa y 50 kDa de *A. flexuosa* usadas para identificar y caracterizar las secuencias proteicas. Dichos péptidos se designan SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9 y SEC ID N° 10.

ES 2 301 174 T3

Los promotores preferidos de la presente invención son promotores de una proteína secretable de hongo filamentos, más preferiblemente un promotor de *cbh1* de *T reesei*.

Ejemplos de vectores de expresión recombinantes son los plásmidos pALK945, pALK948, pALK1021 y pALK1022, que se construyen como se muestra en la figura 17 y contienen la SEC ID N° 11, SEC ID N° 13, SEC ID N° 15 y SEC ID N° 17, respectivamente y que codifican las secuencias de aminoácidos que comprenden la SEC ID N° 12, SEC ID N° 14, SEC ID N° 16, y SEC ID N° 18 como se muestra en la Figura 19.

Todas las proteínas que comprenden la SEC ID N° 12, SEC ID N° 14, SEC ID N° 16, y SEC ID N° 18 tienen una secuencia de ADN N-terminal SEC ID N° 5, que es idéntica a la secuencia N-terminal de la xilanasas de *A. flexuosa* de tipo silvestre (D-T-T-I-T-Q).

La presente invención proporciona adicionalmente una preparación que contiene una o más proteínas o enzimas, preferiblemente xilanasas que se originan a partir de bacterias, especialmente de actinomicetes en un medio de cultivo esencialmente sin células, que puede someterse a procedimientos de procesamiento descendente adecuados.

La preparación que contiene enzimas, especialmente xilanasas que se originan a partir de actinomicetes, se puede obtener cultivando huéspedes transformados con los vectores de expresión de la presente invención. Estas preparaciones son útiles, por ejemplo, para blanqueado asistido con enzimas, porque las enzimas son estables a las temperaturas de procesamiento, cuando las temperaturas de procesamiento están en los intervalos de 50-90°C, preferiblemente 60-85°C, más preferiblemente 70-80°C.

Especialmente, dichas preparaciones son útiles para tratar pulpa para la fabricación de papel y para el tratamiento enzimático de biomasa vegetal.

Por lo tanto, el objetivo principal de esta invención es producir de forma más eficaz xilanasas de origen bacteriano en hongos filamentosos tales como *Trichoderma*. Preferiblemente, el huésped es *Trichoderma reesei* y las xilanasas se originan a partir de actinomicetes.

La Figura 1 muestra el efecto del pH sobre la actividad de la xilanasas de *Actinomadura flexuosa* DSM43186 (sobrenadante de cultivo) a 50°C.

Las Figuras 2A, 2B y 2C muestran el efecto de la temperatura sobre la actividad xilanasas de *A. flexuosa* DSM43186 (sobrenadante de cultivo) a valores de pH de 6,9, 7,8 y 9,0 y en los momentos puntuales de 0, 30, 60 y 120 minutos. La mayor actividad xilanasas del experimento completo se describe como el 100% y todos los demás valores de actividad son proporcionales al mismo.

La Figura 2A muestra las actividades en una temperatura de 60°C.

La Figura 2B muestra las actividades en una temperatura de 70°C.

La Figura 2C muestra las actividades en una temperatura de 80°C.

La Figura 3 muestra el perfil de elución de cromatografía en DEAE Sepharose CL-6B de xilanasas de *A. flexuosa* DSM43186.

La Figura 4A muestra el perfil de elución de cromatografía en Fenil Sepharose CL-4B de la combinación I de DEAE de la Figura 3. Se indican las fracciones que se combinaron para proporcionar la muestra DEPS I/1.

La Figura 4B muestra el perfil de elución de cromatografía en Fenil Sepharose CL-4B de la combinación II de DEAE de la Figura 3. Se indican las fracciones que se combinaron para proporcionar la muestra DEPS II/1 y DEPS II/2.

La Figura 4C muestra el perfil de elución de cromatografía en Fenil Sepharose CL-4B de la combinación III de DEAE de la Figura 3. Se indican las fracciones que se combinaron para proporcionar la muestra DEPS III/1 y DEPS III/2.

La Figura 5A muestra el patrón de tinción proteica con Azul Brillante de Coomassie de las diversas combinaciones cromatográficas. Carril 1: marcadores de peso molecular; carril 2: medio; carril 3: DEPS (Combinación I/1); carriles 4 y 5: DEPS (Combinación II/1 y II/2, respectivamente); carril 6: vacío; carriles 7 y 8: DEPS (Combinación III/1 y III/2, respectivamente). DEPS: Fracciones después de la cromatografía en DEAE mostrada en la Figura 3 y la cromatografía en Fenil Sepharose mostrada en las Figuras 4A-4C.

La Figura 5B muestra el análisis de transferencia de Western de las diversas combinaciones cromatográficas teñidas en la Figura 5A. Se usó antisuero policlonal producido contra la xilanasas XynA de *Thermomonospora fusca* para la detección. Carril 1: marcadores de peso molecular; carril 2: medio; carril 3: DEPS (Combinación I/1); carriles 4 y 5: DEPS (Combinación II/1 y II/2, respectivamente); carril 6: vacío; carriles 7 y 8: DEPS (Combinación III/1 y III/2, respectivamente). DEPS: Fracciones después de la cromatografía en DEAE mostrada en la Figura 3 y la cromatografía en Fenil Sepharose mostrada en las Figuras 4A-4C.

ES 2 301 174 T3

La Figura 6A muestra el perfil de elución de cromatografía en Fenil Sepharose FF del permeado del flujo de DEAE. Se indican los tubos que se combinaron para proporcionar la muestra PF1 y PF2.

La Figura 6B muestra el perfil de elución de cromatografía en Fenil Sepharose FF del concentrado del flujo de DEAE. Se indican los tubos que se combinaron para proporcionar la muestra KF1, KF2 y KF3.

La Figura 7A muestra el patrón de tinción proteica con Azul Brillante de Coomassie de las diversas combinaciones cromatográficas. Las abreviaturas son como en las Figuras 6A y 6B. Carriles 1 y 10: marcadores de peso molecular; carril 2: medio; carril 3: PF1; carril 4: PF2; carril 5: KF1; carril 6: KF2; carril 7: KF3; carril 8: concentrado del flujo de DEAE; carril 9: vacío.

La Figura 7B muestra el análisis de transferencia de Western de las diversas combinaciones cromatográficas teñidas para proteínas en la Figura 7A. Se usó antisuero policlonal producido contra la xilanasas XynA de *T. fusca* para la detección. Las abreviaturas son como en las Figuras 6A y 6B. Carriles 1 y 10: marcadores de peso molecular; carril 2: medio; carril 3: PF1; carril 4: PF2; carril 5: KF1; carril 6: KF2; carril 7: KF3; carril 8: concentrado del flujo de DEAE; carril 9: vacío.

La Figura 8 muestra la termoestabilidad de la xilanasas de 35 kDa de *A. flexuosa* (AM35) purificada a 70°C, pH 6 con y sin albúmina de suero bovino (BSA) añadida. La muestra enzimática se incubó en tampón de McIlvain +/- BSA (100 µg/ml). Las muestras se recogieron después de 0, 2, 6, y 24 horas de incubación y el ensayo de actividad enzimática se hizo a pH 6,5, 60°C.

La Figura 9 muestra la termoestabilidad de la xilanasas de 50 kDa de *A. flexuosa* (AM50) purificada a 70°C, pH 6 con y sin BSA añadida. La muestra enzimática se incubó en tampón de McIlvain +/- BSA (100 µg/ml). Las muestras se recogieron después de 0, 2, 6 y 24 horas de incubación y el ensayo de actividad enzimática se hizo a pH 6,5, 60°C.

La Figura 10A muestra el efecto del pH sobre la actividad de la xilanasas de 35 kDa a 80°C.

La Figura 10B muestra el efecto del pH sobre la actividad de la xilanasas de 50 kDa a 60°C (cuadrados cerrados), 70°C (cuadrados abiertos) y 80°C (círculos cerrados).

La Figura 10C muestra el efecto del pH sobre la actividad de las xilanasas de 35 kDa (cuadrados cerrados) y de 50 kDa (cuadrados abiertos) a 60°C con incubaciones de 60 minutos.

La Figura 11 muestra el efecto de la temperatura sobre la actividad de las xilanasas de 35 kDa (cuadrados cerrados) y de 50 kDa (cuadrados abiertos) a pH 7 con incubaciones de 60 minutos.

La Figura 12 es un mapa del plásmido pALK185 (4,5 kb), que contiene el gen de la xilanasas de *T. fusca* (xynA).

La Figura 13 muestra la secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos de 1375 pb de la xilanasas de 35 kDa de *A. flexuosa* DSM43186.

La Figura 14 muestra la secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos de 1864 pb de la xilanasas de 50 kDa de *A. flexuosa* DSM43186.

La Figura 15A muestra una comparación de homología a nivel de aminoácidos entre el péptido AM50 derivado del inserto de 1864 pb y el gen de la xilanasas II de *Actinomyces* sp. FC7 (Nº de acceso U08894). La figura muestra que había una identidad del 70,7% en un solapamiento de 434 aminoácidos.

La Figura 15B muestra una comparación de homología a nivel de aminoácidos entre el péptido AM50 derivado del inserto de 1864 pb y el gen de la xilanasas A de *Streptomyces lividans* (xlnA) (Nº de acceso M64551). La figura muestra que había una identidad del 70,3% en un solapamiento de 489 aminoácidos.

La Figura 16 muestra el casete de expresión pALK193 (12 kb) que contiene el casete de expresión para la producción de la xilanasas XynA de *T. fusca* en *T. reesei*.

La Figura 17 es un mapa del plásmido pALK1022 (13 kb) que contiene el casete de expresión para la producción de la xilanasas de 35 kDa de *A. flexuosa* en *T. reesei*.

La Figura 18 es un mapa del plásmido pALK1055 (4,5 kb) que contiene el gen para la xilanasas de 35 kDa de *A. flexuosa*.

La Figura 19 muestra la secuencia de ADN de la SEC ID Nº 11, SEC ID Nº 13, SEC ID Nº 15 y SEC ID Nº 17 así como las secuencias de aminoácidos correspondientes SEC ID Nº 12, SEC ID Nº 14, SEC ID Nº 16 y SEC ID Nº 18, que comprenden las fusiones entre el núcleo/bisagra de *man1* y el gen *am35* para pALK945, pALK948, pALK1021 y pALK1022.

La Figura 20 muestra la estabilidad térmica de la actividad xilanasa a partir de los sobrenadantes de cultivo de *A. flexuosa* DSM43186 y transformantes de *T. reesei* elegidos que producen xilanasa de 35 kDa de *A. flexuosa*. Las muestras de los sobrenadantes de cultivo se incubaron a 70°C, pH 7 en tampón de McIlvain (se añadió BSA a 100 µg/ml) durante 0, 15, 30, 60 y 120 minutos después de que se determinaran las actividades xilanasa a partir de la muestra a 70°C, pH 7 (5 minutos de incubación).

La Figura 21 muestra un análisis de transferencia de Western de los sobrenadantes de cultivo a partir de los transformantes que producen la xilanasa AM35 de *A. flexuosa*. Se usó antisuero policlonal producido contra la β -mananasa purificada (pI 5,4) de *T. reesei* RutC30 para la detección. Carril 1: marcador de peso molecular preteñido (Bio-Rad, U.S.A.); carriles 2-3: muestra proteica de β -mananasa purificada de 53 kDa; carril 4: medio de cultivo de la cepa que produce el núcleo de MANI, ALKO 3620/pALK1010/24; carril 5: medio de cultivo de la cepa huésped de transformación ALKO3620; carriles 6-10: medios de cultivo de los transformantes ALKO3620/pALK945/8, ALKO3620/pALK945/6, ALKO3620/pALK948/7, ALKO3620/pALK1022/29 y ALKO3620/pALK1021/4, respectivamente.

La Figura 22 muestra un análisis de transferencia de Western de sobrenadantes de cultivo de transformantes que producen xilanasa de *A. flexuosa*. Se usó antisuero policlonal producido contra la xilanasa de 35 kDa purificada de *A. flexuosa* para la detección. Carril 1: marcador de peso molecular preteñido (Bio-Rad, U.S.A.); carril 2: xilanasa de 35 kDa purificada de *A. flexuosa* DSM43186; carril 3: muestra proteica de β -mananasa de 53 kDa; carril 4: medio de cultivo de la cepa que produce el núcleo de MANI, ALKO3620/pALK1010/24; carril 5: medio de cultivo del huésped de transformación ALKO3620; carriles 6-10: medios de cultivo de los transformantes ALKO3620/pALK945/8, ALKO3620/pALK945/6, ALKO3620/pALK948/27, ALKO3620/pALK1022/29 y ALKO3620/pALK1021/4, respectivamente.

Figura 23A: transferencia de Western de muestras de medio de cultivo de una fermentación discontinua de ALKO3620/pALK945/8. Anticuerpo policlonal producido contra la xilanasa de 35 kDa purificada de *A. flexuosa*. Carril 1 y 9: patrones de masa molecular preteñidos (LMW, Bio-Rad); carriles 3 a 8: muestras de medio de cultivo después de 7, 6, 5, 4, 3 y 2 días de tiempos de fermentación, respectivamente; carril 2: muestra final después de 7,3 días de fermentación.

Figura 23B: transferencia de Western de muestras de medio de cultivo de una fermentación de laboratorio de ALKO3620/pALK945/6. Anticuerpo policlonal producido contra la xilanasa de 35 kDa purificada de *A. flexuosa*. Carril 1: patrones de masa molecular preteñidos (LMW, Bio-Rad); carriles 2 a 6: muestras de medio de cultivo después de 1, 2, 3, 4 y 5 días de tiempos de fermentación, respectivamente.

Figura 24: SDS-PAGE de xilanasas purificadas recombinantes de 35 kDa de *A. flexuosa* y xilanasa de 35 kDa de tipo silvestre de *A. flexuosa*. Carriles 1 y 8: patrones de masa molecular preteñidos (Bio-Rad); carril 3: xilanasa purificada de tipo silvestre de 35 kDa; carril 4: xilanasa purificada de 33,4 kDa; carril 5: xilanasa purificada de 23,8 kDa; carril 6: xilanasa purificada de 22 kDa; carriles 2 y 7: vacíos.

Figura 25: Dependencia de la temperatura y el pH de xilanasas recombinantes de 35 kDa de *A. flexuosa* purificadas y de tipo silvestre. Las incubaciones se realizaron a las temperaturas y valores de pH indicados durante 60 min. con xilano de abedul al 1% (p/v) (Roth 7500) como sustrato.

45 Depósitos

Los plásmidos pALK923, pALK938, pALK939, pALK940, pALK941 y pALK1056 se depositaron en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig, Alemania con los números de acceso asignados DSM9322, DSM9899, DSM9900, DSM9901, DSM9902 y DSM9903, respectivamente. pALK923 se depositó el 27 de julio de 1994, y pALK938-941 y pALK1056 se depositaron el 3 de abril de 1995.

Los plásmidos pALK927 y pALK928 se depositaron en el DSM el 27 de septiembre de 1994, y con los números de acceso asignados DSM9447 y DSM9448, respectivamente.

55 Descripción Detallada de las Realizaciones Preferidas

I. Definiciones

En la siguiente descripción, se utilizan extensivamente varios términos usados en la tecnología de ADN recombinante. Para proporcionar un entendimiento más claro y coherente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, incluyendo el alcance a dar a dichos términos, se proporcionan las siguientes definiciones.

Vehículo de clonación. Un ADN plasmídico o fágico u otra secuencia de ADN (tal como un ADN lineal) que proporciona un entorno de ácido nucleico apropiado para la transferencia de un gen de interés en una célula huésped. Los vehículos de clonación de la invención pueden diseñarse para que se repliquen de forma autónoma en huéspedes procariotas y eucariotas. En huéspedes fúngicos tales como *Trichoderma*, los vehículos de clonación generalmente no se replican de forma autónoma y en su lugar, simplemente proporcionan un vehículo para el transporte del gen de

interés en el huésped *Trichoderma* para la inserción posterior en el genoma de *Trichoderma*. El vehículo de clonación puede caracterizarse adicionalmente por uno o una pequeña cantidad de sitios de reconocimiento de endonucleasas en los que dichas secuencias de ADN pueden cortarse de un modo determinable sin pérdida de una función biológica esencial del vehículo, y en los que el ADN puede sufrir corte y empalme para provocar la replicación y clonación de dicho ADN. El vehículo de clonación puede contener adicionalmente un marcador adecuado para su uso en la identificación de células transformadas con el vehículo de clonación. Los genes marcadores adecuados son, por ejemplo, genes marcadores que proporcionan resistencia a antibióticos, pero también existen otros marcadores útiles, por ejemplo, genes que proporcionan resistencia a biocidas así como a metales pesados, tales como genes que proporcionan resistencia al cobre. Como alternativa, dichos marcadores pueden proporcionarse en un vehículo de clonación que es diferente del que suministra el gen de interés usando el llamado sistema de cotransformación. La palabra “vector” a veces se usa para “vehículo de clonación”.

Vehículo de expresión. Un vehículo o vector de expresión es similar a un vehículo de clonación pero es capaz de expresar un gen de interés, después de la introducción por transformación en un huésped deseado. Cuando se usa un huésped fúngico, el gen de interés se proporciona preferiblemente a un huésped fúngico como parte de un vehículo de clonación o expresión que se integra en el cromosoma fúngico. Las secuencias que derivan del vehículo de clonación o el vehículo de expresión también pueden integrarse con el gen de interés durante el proceso de integración. Por ejemplo, en *T. reesei*, el gen de interés puede dirigirse al locus *cbh1*.

El gen de interés puede colocarse preferiblemente bajo el control de (es decir, unido de forma funcional a) ciertas secuencias de control tales como secuencias promotoras proporcionadas por el vector (que se integran con el gen de interés), si se desea, dichas secuencias de control pueden proporcionarse por el cromosoma del huésped como resultado del locus de inserción.

Las secuencias de control de la expresión en un vector de expresión variarán dependiendo de si el vector está diseñado para expresar un cierto gen en un huésped procariota o eucariota (por ejemplo, un vector lanzadera, puede proporcionar un gen para la selección en diferentes huéspedes microbianos) y pueden contener adicionalmente elementos transcripcionales tales como elementos potenciadores, secuencias de terminación, y/o sitios de inicio y terminación de la traducción.

Homólogo. Por una enzima “homóloga” a un huésped de la invención se entiende que una cepa no transformada de la misma especie que la especie huésped produce de forma natural alguna cantidad de la proteína nativa; por un gen “homólogo” a un huésped de la invención se entiende un gen encontrado en el genoma de una cepa transformada de la misma especie que la especie huésped. Por una enzima “heteróloga” a un huésped de la invención se entiende que una cepa no transformada de la misma especie que la especie huésped no produce de forma natural alguna cantidad de la proteína nativa; por un gen “heterólogo” a un huésped de la invención se entiende un gen no encontrado en el genoma de una cepa no transformada de la misma especie que la especie huésped.

Xilanasas. Como se usa en este documento, una xilanasas es una hemicelulasas que corta los enlaces β -1,4 en la cadena xilósica del xilano (el xilano es un polímero de restos D-xilosa que están unidos a través de enlaces β -1,4). La actividad xilanasas es sinónima de la actividad xilanólítica. Más específicamente, la actividad xilanólítica significa una actividad similar o idéntica a la actividad xilanólítica de *A. flexuosa* de 35 kDa (AM35) y *A. flexuosa* de 50 kDa (AM50), las características, por ejemplo la termoestabilidad se describen más específicamente y se definen en la descripción detallada y los ejemplos.

Por una secuencia de aminoácidos que es un “equivalente” de una secuencia de aminoácidos específica se entiende una secuencia de aminoácidos que no es idéntica a la secuencia de aminoácidos específica, pero en su lugar contiene al menos algunos cambios de aminoácidos (deleción, sustituciones, inversiones, inserciones, etc.) que no afectan de forma esencial a la actividad biológica de la proteína en comparación con una actividad similar de la secuencia de aminoácidos específica, cuando se usa para un propósito deseado. Preferiblemente, una secuencia de aminoácidos “equivalente” contiene una identidad de al menos el 85%-99% a nivel de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos específica, más preferiblemente al menos el 90% y en una realización muy preferible especialmente, una identidad de al menos el 95%, a nivel de aminoácidos. En el caso de deleciones mayores, por ejemplo, la retirada de la región de cola, la comparación se realiza con la secuencia de aminoácidos del área correspondiente en la secuencia original.

Dominios Funcionales. La expresión en relación a una proteína fúngica secretable incluye, por ejemplo, la secuencia de señal de secreción o una secuencia señal y prosequencia de la proteína secretable o parte de la proteína, que contiene secuencias que permiten que las proteínas o construcciones de fusión se secreten. En otras palabras, la expresión “dominio funcional” significa una región de una secuencia de ADN que codifica una región específica de una proteína. En esta invención la expresión “dominio funcional” significa las regiones de la secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos responsable de la función catalítica o enzimática (el dominio central) o la función de unión (el dominio de cola). La función de unión es responsable de la unión de la proteína o enzima respectiva, por ejemplo a xilano o celulosa. El dominio específico también puede ser un dominio de plegamiento, que es responsable de la estructura terciaria de la proteína, por ejemplo, codifica una estructura de α -hélice o lámina β de una proteína o una combinación de las mismas. El dominio funcional también puede ser responsable de la actividad inmunológica de la proteína. Por tanto, el “dominio funcional” puede comprender una señal de secreción o la secuencia central o una secuencia responsable del plegamiento de la proteína expuesta anteriormente. Dichos dominios funcionales pueden estar totalmente separados entre sí y ser responsables de la actividad “biológica” de la proteína. Por actividad “biológica”

gica” de una secuencia de aminoácidos de la invención se entiende la actividad enzimática, funcional, de plegamiento o unión o una combinación de dichas actividades de la proteína fúngica secretable. En esta invención la expresión “dominio funcional” se refiere específicamente a un dominio de cola de una celulasas o un dominio central y de bisagra de una mananasa, derivando dichos dominios de *Trichoderma*.

Preparación o preparación enzimática. Por “preparación o preparación enzimática” se entiende una composición que contiene proteínas o enzimas que están presentes en el medio de cultivo y de la que se han retirado las células huésped después de que se haya completado el cultivo o la fermentación. La preparación o preparación enzimática puede procesarse adicionalmente por procedimientos de procesamiento descendente, que son apropiados para la aplicación de la proteína o enzima. Las proteínas o enzimas pueden estar parcial o completamente aisladas y purificadas. Para uso a granel, la preparación o preparación enzimática habitualmente se somete a filtración y/o centrifugación para retirar las células huésped del medio de cultivo usado. Por tanto, la expresión “preparación o preparación enzimática” en la presente invención significa preparaciones enzimáticas sin refinar para su uso a granel, pero también xilanasas de actinomicetes, que pueden estar altamente purificadas por razones especiales.

Por un huésped que es “sustancialmente incapaz” de sintetizar una o más enzimas se entiende un huésped en el que la actividad de una o más de las enzimas enumeradas está deprimida, reprimida, deficiente, o ausente en comparación con el tipo silvestre.

Blanqueado asistido con enzimas. Por “ Blanqueado asistido con enzimas” se entiende la extracción de lignina residual de la pulpa de fabricación de papel después de la acción de las enzimas de degradación de hemicelulosa con o sin enzimas de degradación de lignina. La retirada o extracción de lignina puede estar restringirse por hemicelulosas físicamente (a través de reprecipitación sobre la superficie de la fibra durante el cocido) o químicamente (a través de complejos lignina-carbohidrato). La actividad hemicelulasas degrada parcialmente la hemicelulosa, que potencia la capacidad de extracción de ligninas por compuestos químicos de blanqueado convencionales (como cloro, dióxido de cloro, peróxido, etc.) (Viikari y col., “Bleaching with Enzymes” en *Biotechnology in the Pulp and Paper industry*, Proc. 3rd Int. Conf., Stockholm, pág. 67-69 (1986); Viikari y col., “Applications of Enzymes in Bleaching” en Proc. 4th Int. Symp. Wood and Pulp Chemistry, Paris, Vol. 1, pág. 151-154 (1987); Kantelinen y col., “Hemicellulases and their Potential Role in Bleaching” en *International Pulp Bleaching Conference*, Tappi Proceedings, pág. 1-9 (1988)). La ventaja de esta capacidad de blanqueado mejorada es un menor consumo de compuestos químicos de blanqueado y menores cargas medioambientales o mayores valores de brillo final. En el pasado, esto a menudo se ha conocido como bioblanqueado.

II. Modificación Genética de los Huéspedes de la Invención

El problema de producir proteínas bacterianas, preferiblemente xilanasas de actinomicetes de un modo rentable a gran escala se resuelve produciendo las proteínas en hongos filamentosos, *Trichoderma*. El procedimiento para producir de forma eficaz proteínas bacterianas en hongos filamentosos se facilita a través de la clonación de secuencias genéticas que codifican la actividad proteica deseada y a través de la expresión de dichas secuencias genéticas en hongos filamentosos. Como se usa en este documento, la expresión “secuencias genéticas” pretende hacer referencia a una molécula de ácido nucleico (preferiblemente ADN). Las secuencias genéticas que codifican las proteínas deseadas incluyen ADN de actinomicetes, ADNc, ADN sintético y combinaciones de los mismos, preferiblemente ADN de actinomicetes, ADNc, ADN sintético y combinaciones de los mismos que codifican xilanasas, más preferiblemente ADN genómico de *Actinomyces*, ADNc, ADN sintético y combinaciones de los mismos. Pueden usarse sistemas de vector para producir huéspedes para la producción de las preparaciones enzimáticas de la invención. Dicha construcción de vector (a) puede proporcionar adicionalmente una construcción de vector diferente (b) que codifique al menos un gen deseado a integrar en el genoma del huésped y (c) un marcador de selección acoplado a (a) o (b). Como alternativa, puede usarse un vector diferente para el marcador.

Una molécula de ácido nucleico, tal como ADN, se dice que es “capaz de expresar” un polipéptido si contiene secuencias de control de la expresión que contienen información reguladora de la transcripción y dichas secuencias están “unidas de forma funcional” a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido.

Un enlace funcional es un enlace en el que una secuencia está conectada a una secuencia (o secuencias) reguladora de tal modo que se coloque la expresión de la secuencia bajo la influencia o control de la secuencia reguladora. Se dice que dos secuencias de ADN (tal como una secuencia que codifica una proteína y una secuencia de la región promotora unida al extremo 5' de la secuencia codificante) están unidas de forma funcional si la inducción de la función promotora provoca la transcripción del ARNm de la secuencia que codifica la proteína y si la naturaleza del enlace entre las dos secuencias de ADN (1) no provoca la introducción de una mutación de cambio de fase, (2) no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión para dirigir la expresión del ARNm, ARN antisentido, o proteína, o (3) no interfiere con la capacidad del molde de transcribirse por la secuencia de la región promotora. Por tanto, una región promotora estaría unida de forma funcional a una secuencia de ADN si el promotor fuera capaz de realizar la transcripción de esa secuencia de ADN.

La naturaleza precisa de las regiones reguladoras necesarias para la expresión génica puede variar entre especies o tipos celulares, pero en general incluirán, según sea necesario, secuencias 5' no transcritas y 5' no traducidas (no codificantes) implicadas en el inicio de la transcripción y la traducción respectivamente.

La expresión de la proteína en los huéspedes transformados requiere el uso de regiones reguladoras funcionales en dichos huéspedes. Puede emplearse una amplia diversidad de secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción. En eucariotas, donde la transcripción no está unida a la traducción, dichas regiones de control pueden o no proporcionar un codón de metionina iniciador (AUG), dependiendo de si la secuencia clonada contiene dicha metionina. Dichas regiones, en general, incluirán una región promotora suficiente para dirigir el inicio de la síntesis de ARN en la célula huésped.

Como se sabe ampliamente, la traducción de ARNm eucariota se inicia en el codón que codifica la primera metionina. Por esta razón, es preferible asegurar que el enlace entre un promotor eucariota y una secuencia de ADN que codifica la proteína, o un derivado funcional del mismo, no contiene ningún codón intermedio que sea capaz de codificar una metionina. La presencia de dichos codones provoca la formación de una proteína de fusión (si el codón AUG está en la misma fase de lectura que la secuencia de ADN que codifica la proteína) o una mutación de cambio de fase (si el codón AUG no está en la misma fase de lectura que la secuencia que codifica la proteína).

En una realización preferida, se secreta una proteína deseada en el medio adyacente debido a la presencia de una secuencia señal de secreción. Si una proteína deseada no tiene su propia secuencia señal, o si dicha secuencia no funciona bien en el huésped, entonces la secuencia que codifica la proteína puede unirse de forma funcional a una secuencia señal homóloga o heteróloga al huésped. La secuencia codificante deseada puede unirse a cualquier secuencia señal que permita la secreción de la proteína desde el huésped. Dichas secuencias señal pueden diseñarse con o sin sitios de proteasa específicos de modo que la secuencia peptídica señal sea susceptible a posterior retirada. Como alternativa, puede usarse un huésped que filtre la proteína en el medio, por ejemplo un huésped con una mutación en su membrana.

Si se desea, las regiones no transcritas y/o no traducidas 3' a la secuencia que codifica una proteína pueden obtenerse por los procedimientos de clonación descritos anteriormente. La región 3' no transcrita puede retenerse por sus elementos de la secuencia reguladora de la terminación de la transcripción; la región 3' no traducida puede retenerse por sus elementos de la secuencia reguladora de la terminación de la traducción, o por los elementos que dirigen la poliadenilación en células eucariotas.

Los vectores de la invención pueden comprender adicionalmente otros elementos reguladores unidos de forma funcional tales como secuencias potenciadoras.

En una realización preferida, se construyen transformantes genéticamente estables por lo cual se integra un ADN proteico deseado en el cromosoma del huésped. Dicha integración puede suceder *de novo* en la célula o, en una realización más preferida, puede estar ayudada por introducción por transformación de un vector que se inserta funcionalmente por sí mismo en el cromosoma del huésped, por ejemplo, elementos de ADN que promueven la integración de las secuencias de ADN en cromosomas.

Las células que han integrado de forma estable el ADN introducido en sus cromosomas se seleccionan también introduciendo uno o más marcadores que permiten la selección de las células huésped que contienen el vector de expresión en el cromosoma, por ejemplo, el marcador puede proporcionar resistencia a biocidas, por ejemplo, resistencia a antibióticos, o metales pesados, tales como cobre, o similares. El gen marcador de selección puede unirse directamente a las secuencias génicas de ADN a expresar, o introducirse en la misma célula por co-transfección.

Los factores de importancia en la selección de un plásmido particular o vector viral incluyen: la facilidad con que las células receptoras que contienen el vector pueden reconocerse y seleccionarse de aquellas células receptoras que no contienen el vector; la cantidad de copias del vector que se desea en un huésped particular; y si es deseable que sea capaz de "lanzar" el vector entre células huésped de diferentes especies.

Una vez que el vector o la secuencia de ADN que contiene la(s) construcción(es) se ha preparado para la expresión, la(s) construcción(es) de ADN se introduce(n) en una célula huésped apropiada por cualquiera de una diversidad de medios adecuados, incluyendo la transformación como se ha descrito anteriormente. Después de la introducción del vector, las células receptoras se cultivan en un medio selectivo, que selecciona el crecimiento de células transformadas. La expresión de la(s) secuencia(s) clonada(s) provoca la producción de la proteína deseada, o la producción de un fragmento de esta proteína. Esta expresión puede tener lugar de un modo continuo en las células transformadas, o de un modo controlado.

Por consiguiente, las secuencias que codifican proteínas bacterianas pueden unirse de forma funcional a cualquier vector deseado e introducirse por transformación en un huésped fúngico filamentoso seleccionado, preferiblemente un huésped *Trichoderma*, para proporcionar la expresión de dichas proteínas en ese huésped.

Para facilitar la secreción de la proteína bacteriana, las secuencias que codifican las proteínas bacterianas pueden fusionarse en fase a otras secuencias para construir ADN que codifique una proteína de fusión. Por ejemplo, se fusiona un vector recombinante que codifica un gen de xilanas de origen actinomicete con la secuencia de uno o más dominios funcionales de celulasa o mananasa de *Trichoderma* como se describe en los documentos US 5.298.405, WO 93/24622 y en Stalbrand y col., Appl. Environ. Microbiol. 61:1090-1097 (1995). Los dominios funcionales se seleccionan entre el grupo constituido por celobiohidrolasas (CBHI y CBHII), endoglucanasas (EGI y EGII) y mananasa (MANI). MANI tiene la misma estructura de dominio que la de las celulasas: un dominio central, que contiene el sitio activo, un dominio de bisagra que contiene una región rica en serina-treonina, y una cola, que contiene el dominio de unión.

Pueden construirse péptidos de fusión que contengan un dominio central y de bisagra de mananasa N-terminal fusionado con la secuencia de xilanasas de *Actinomadura*. El resultado es una proteína que contiene las regiones central y de bisagra de mananasa N-terminales, y una xilanasas de *Actinomadura* C-terminal. La proteína de fusión contiene tanto actividad mananasa como xilanasas de los diversos dominios proporcionados en la construcción de fusión. Una alternativa adicional es usar un gen que codifique un dominio central y de bisagra de mananasa modificado o inactivo fusionado a secuencias de xilanasas de *Actinomadura*. La proteína de fusión resultante entonces contiene el dominio enzimático modificado o inactivo fusionado a una secuencia bacteriana deseada.

También pueden construirse proteínas de fusión de modo que se incluya la cola de celobiohidrolasa o endoglucanasa, colocada antes de la secuencia de xilanasas de *Actinomadura*, especialmente para permitir el uso de un sitio de proteasa no específico en la cola como un sitio de proteasa para la recuperación de la secuencia de xilanasas a partir de la proteína de fusión expresada. Como alternativa, pueden construirse proteínas de fusión que proporcionen un sitio de proteasa en un garce que se coloca antes de la secuencia de xilanasas de *Actinomadura*.

Por consiguiente, esta invención provoca la producción y secreción de xilanasas de actinomicetes, en huéspedes *Trichoderma*. La xilanasas de actinomicetes está codificada como una fusión a una secuencia de ADN que codifica un dominio de cola de una celulasa de *Trichoderma*, o un dominio central y de bisagra de una mananasa de *Trichoderma*, provocando de este modo un elevado nivel de expresión y secreción. La mejora en la secreción de xilanasas de actinomicetes es más de diez veces en comparación con la producción y secreción de xilanasas de actinomicetes sin una fusión del gen que codifica la xilanasas de actinomicetes a una secuencia de ADN fúngico que codifica un dominio de una proteína secretable. Cuando se produce una proteína de mamífero tipo quimiosina como una proteína de fusión en *Aspergillus*, el nivel de producción ha sido solamente el 10-20% de los niveles de producción de esta invención (documento WO 90/15860). Asimismo, el nivel de producción de inmunoglobulinas en *Trichoderma* ha sido solamente el 10-20% de los niveles de producción de esta invención (documento WO 92/01797).

Hay muy pocos informes relacionados con la producción de proteínas o enzimas de origen bacteriano en hongos filamentosos: se ha informado de la producción de endoglucanasa de *Cellulomonas fimi* (Gwynne y col., Bio/Technology 5: 713-719 (1987)); y β -glucuronidasa de *E. coli* (Punt y col., J. Biotechnol. 17: 19-34(1991)) en *A. nidulans*. De estas enzimas, la endoglucanasa se secretó en el medio de cultivo en el intervalo de 10-15 mg de proteína por litro, la β -glucuronidasa solamente fue detectable de forma intracelular.

Muchos de los estudios sobre expresión de genes heterólogos se han referido a genes de mamíferos (van den Hondel y col., Heterologous gene expression in filamentous fungi, Ed. Bennett y Lasure. More Gene Manipulations in Fungi Academic Press, San Diego, U.S.A., pág. 396-428 (1991)). Hasta ahora, los rendimientos iniciales de enzimas eucariotas en hongos filamentosos han estado en un intervalo de decenas de mg por litro en cultivos de matraz en agitación. En la publicación de patente internacional WO 90/15860 se describió la secreción de quimiosina por *A. niger* var. *awamori* usando una fusión al gen homólogo de la glucoamilasa. Nyssönen y col., Bio/Technology 11:591-595 (1993) describen la producción de fragmentos de anticuerpo en *Trichoderma reesei*. El mejor rendimiento de fragmentos de anticuerpo es cuando se producen como una fusión al gen de la celobiohidrolasa I de *T. reesei* en el intervalo de 40 mg por litro en un cultivo de matraz en agitación.

III. Las preparaciones enzimáticas de la invención

De acuerdo con la invención, se proporciona un vector de expresión recombinante para producir xilanasas de actinomicetes. Estas enzimas se sintetizan como proteínas de fusión. La proteína vehículo en la fusión es un dominio de cola de una celulasa homóloga, o un dominio central y de bisagra de una mananasa homóloga que se secreta fácilmente desde el huésped *Trichoderma*.

Las composiciones enzimáticas de la invención satisfacen, por ejemplo, los requisitos de las necesidades específicas en diversas aplicaciones en la industria de la pulpa y el papel. Estas aplicaciones incluyen, por ejemplo, blanqueado potenciado por enzimas de pulpa de fabricación del papel, tratamiento enzimático de las fibras durante la agitación, aumento enzimático de las velocidades de drenaje y retirada de tinta de fibras secundarias así como retirada de depósitos enzimáticos.

La invención se aplica para producir una preparación enzimática parcial o totalmente deficiente en actividad celulolítica (es decir, en la capacidad de degradar la celulosa) y enriquecida en xilanasas deseable para el blanqueado potenciado por enzimas de pulpa química. Por deficiente en actividad celulolítica se entiende una capacidad reducida, disminuida, deprimida, o reprimida de degradar la celulosa. Dichas preparaciones deficientes celulolíticas, y la fabricación de las mismas por procedimientos de ADN recombinante, se describen en el documento US 5.298.405, incorporado en este documento por referencia. Como se describe en este documento, las xilanasas pueden proporcionarse directamente por los huéspedes de la invención (los propios huéspedes se colocan en el medio de procesamiento de la madera). Como alternativa, puede usarse medio usado del cultivo de los huéspedes, o enzimas purificadas del mismo. Además, si desea que estén presentes actividades en más de un huésped recombinante, dichas preparaciones pueden aislarse de los huéspedes apropiados y combinarse para su uso en el procedimiento de la invención.

Para obtener las preparaciones enzimáticas de la invención, los huéspedes recombinantes *Trichoderma* descritos anteriormente que tienen las propiedades deseadas (es decir, por ejemplo, huéspedes capaces de expresar grandes cantidades de las enzimas xilanasas de actinomicetes y opcionalmente, aquellos que son sustancialmente incapaces de

secretar una o más enzimas celulasa) se cultivan en condiciones adecuadas, las xilanasas de actinomicetes deseadas se secretan desde los huéspedes *Trichoderma* en el medio de cultivo, y la preparación enzimática se recupera de dicho medio de cultivo por procedimientos conocidos en la técnica.

La preparación enzimática es el medio de cultivo con o sin las células huésped nativas o transformadas, o se recupera del mismo por la aplicación de procedimientos conocidos en la técnica. Sin embargo, como las enzimas xilanasas se secretan en los medios de cultivo y presentan actividad en las condiciones ambiente del licor hemicelulolítico, es una ventaja de la invención que las preparaciones enzimáticas de la invención puedan utilizarse directamente del medio de cultivo sin purificación adicional. Si se desea, dichas preparaciones pueden liofilizarse o la actividad enzimática puede concentrarse de otro modo y/o estabilizarse para su almacenamiento. Las preparaciones enzimáticas de la invención son muy económicas de proporcionar y usar porque

(1) las enzimas pueden usarse en una forma sin refinar; es innecesario el aislamiento de una enzima específica del fluido de cultivo y

(2) como las enzimas se secretan en el medio de cultivo, solamente necesita recuperarse el medio de cultivo para obtener la preparación enzimática deseada; no hay necesidad de extraer una enzima de los huéspedes.

Si se desea, puede purificarse adicionalmente una xilanasas expresada de acuerdo con condiciones convencionales, tales como extracción, precipitación, cromatografía, cromatografía de afinidad, electroforesis, o similares.

IV. Identificación y Aislamiento de Xilanasas de *Actinomadura flexuosa*

Se han identificado, purificado y clonado dos xilanasas de *Actinomadura flexuosa*. Estas dos xilanasas tienen un pH óptimo y termoestabilidad que son deseables para el blanqueado asistido con enzimas de la pulpa de madera. Una de estas xilanasas tiene un peso molecular de aproximadamente 35 kDa (AM35) y la otra tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kDa (AM50).

El intervalo de temperatura óptima para las xilanasas de *A. flexuosa* en preparaciones sin refinar es de 70-80°C a pH 6-7. A pH 8, el intervalo de temperatura óptimo de esta preparación de xilanasas es de 60-70°C. Esto es útil en el blanqueado de pulpa de papel kraft porque después del cocido de papel kraft, el pH de la pulpa es alcalino.

En preparaciones purificadas, AM35 retiene el 80% de su actividad, y AM50 retiene el 90% de su actividad después de 24 horas cuando se incuba en presencia de BSA a pH 6,0 y 70°C. A 80°C, tanto AM35 como AM50 son más activas a pH 6 pero ambas muestran una amplia actividad basal entre pH 5 - pH 7, en el que se retiene aproximadamente el 80% de la actividad.

Para el aislamiento de AM35 y AM50, el huésped *A. flexuosa* está disponible como el número de acceso de depósito DSM43186 de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania. Ambas formas pueden purificarse por pasos a través de una serie de columnas cromatográficas. Una primera etapa de purificación por DEAE Sepharose CL-4B retiene aproximadamente la mitad de la actividad xilanasas cuando la muestra se aplica a pH 8,6-9 en Na₂HPO₄ 12,5 mM; la otra mitad se encuentra en el flujo.

La elución de la actividad xilanasas unida con un gradiente salino provoca una elución de un pico de actividad marcado que eluye antes y un amplio pico de actividad que eluye después. El pico marcado que eluye antes retiene su homogeneidad cuando se somete a cromatografía en Fenil Sepharose CL-4B. Las muestras tomadas del amplio pico de actividad posterior se separan en al menos dos picos cuando se someten a cromatografía en Fenil Sepharose CL-4B. Hay solamente una débil reactividad cruzada de éstas últimas xilanasas que eluyen después con un anticuerpo policlonal dirigido contra la xilanasas de *Thermomonospora fusca*.

Por SDS-PAGE, el peso molecular de la xilanasas en estas combinaciones de este retenido de DEAE era aproximadamente 50 kDa, mientras que los pesos moleculares de las xilanasas en el flujo de DEAE eran de 30, 35, 40 y 50 kDa. Por tanto, *A. flexuosa* contiene de cuatro a cinco bandas de proteína xilanasas.

V. Blanqueado Asistido con Enzimas usando las Xilanasas de *Actinomadura flexuosa*

La presente invención comprende un procedimiento para tratar enzimáticamente biomasa vegetal en condiciones de elevada temperatura de 50-90°C y pH 5-8, y especialmente 60-85°C, pH 6-7 y más preferiblemente 70-80°C y pH 7,0 durante una a dos horas. En una realización preferida, la biomasa vegetal se trata con xilanasas que son capaces de hidrolizar cadenas de xilano en pulpa de madera a pH neutro o moderadamente alcalino y elevada temperatura. Como alternativa, el tratamiento enzimático puede combinarse con fases quelantes (fases de retirada de metal) en las que típicamente se usan elevadas temperaturas pero bajos valores de pH (4-6).

La pulpa de madera es un material compuesto que consta principalmente de una matriz de celulosa, hemicelulosa, y lignina. Un procedimiento común para la producción de pulpa de madera es el pulpeo químico. Un modo típico de pulpeo químico es cocido en sulfato alcalino, llamado cocido de papel kraft. En las condiciones de procesamiento (elevadas temperaturas y elevada alcalinidad), los compuestos químicos de cocido extraen la lignina de la pulpa. Sin

embargo, no toda la lignina se retira durante el cocido, sino que parte de ella (aproximadamente el 5%) permanece en la pulpa. Esta lignina residual tiene que retirarse para obtener pulpa adecuada para la producción de papel.

Se han desarrollado muchos procedimientos para la retirada de lignina residual. Típicamente, la pulpa de madera se trata con cloro u otros compuestos químicos tóxicos para retirar el componente de lignina y proporcionar una pulpa blanqueada. Sin embargo, los sub-productos tóxicos de este tratamiento químico tienen un impacto negativo sobre la salud y estabilidad del entorno en que se liberan. Por consiguiente, existe una gran necesidad de desarrollar técnicas alternativas, más protectoras con el medio ambiente para el blanqueado de la pulpa. El tratamiento de la pulpa cocida con enzimas que degradan parcialmente la hemicelulosa, por ejemplo, xilano, en la pulpa, modifica la pulpa de modo que la lignina llega a ser más fácil de extraer o retirar. Esto conduce a una capacidad de blanqueado mejorada que a su vez da las ventajas de menor consumo de compuestos químicos blanqueantes y menores cargas ambientales y/o mayor brillo final.

El uso del vector de expresión recombinante de la presente invención para la producción de xilanasas de actinomicetes proporciona una técnica de blanqueado asistido con enzimas por la cual pueden usarse xilanasas termoestables y neutras en condiciones tales que se disminuye o elimina la necesidad de ajustar el pH y la temperatura después de la etapa de cocido.

En una realización preferida, dicha técnica se realiza *in vitro* en pulpa de madera. La técnica implica colocar la preparación enzimática, medio de cultivo, o mezcla concentrada que contiene xilanasas en contacto con la pulpa de madera. Los cálculos de rutina posibilitan que los especialistas en la técnica determinen la dosificación de la enzima xilanasas usada, pH y temperatura de tratamiento y otros parámetros variables.

Dicha técnica de blanqueado asistido con enzimas puede aplicarse sola o como un suplemento a otros tratamientos que mejoran la retirada de lignina de la pulpa de madera. En una realización preferida, la presente invención se usa para potenciar la capacidad de blanqueado de pulpas de madera, especialmente pulpas químicas.

En una realización preferida, las xilanasas usadas en dicho blanqueado asistido con enzimas son preferiblemente aquellas de *A. flexuosa*, y especialmente las xilanasas de 35 kDa y/o 50 kDa de *A. flexuosa*. Es especialmente útil el medio de cultivo que puede proporcionarse por un huésped recombinante que se ha transformado con los vectores de expresión de la invención.

VI. Realizaciones Preferidas y Adicionales y Aplicabilidad de la Invención

La invención describe un procedimiento mejorado para expresar y secretar xilanasas originadas por bacterias, especialmente por actinomicetes, en hongos filamentosos usando técnicas de proteínas de fusión. Se han obtenido niveles de producción y secreción más de 50 veces mayores que los observados en las cepas de actinomicetes originales. Los niveles de producción y secreción eran más 10 veces mayores que los previamente observados cuando se producen enzimas heterólogas (de mamífero o bacterianas) en hongos filamentosos. El propósito principal de la invención es proporcionar un procedimiento para producir xilanasas originadas por bacterias, especialmente actinomicetes, en hongos filamentosos, *Trichoderma*.

Por tanto, la invención se refiere a un vector de expresión recombinante para la producción de xilanasas de actinomicetes en un huésped *Trichoderma*. Dicho vector comprende un promotor unido de forma funcional a una secuencia de ADN de uno o más dominios funcionales de una proteína de hongo filamentoso secretable, que se fusiona en fase con una secuencia de ADN que codifica una xilanasas de actinomicetes.

Generalmente, la secuencia de ADN que codifica la proteína de hongo filamentoso secretable codifica una enzima, tal como celulasas o hemicelulasas. Las enzimas son homólogas al hongo filamentoso secretor, por ejemplo *Trichoderma*. En las realizaciones más preferidas de la invención, la secuencia de ADN que codifica la proteína de hongo filamentoso secretable es una enzima, que se sabe que se secreta en cantidades significativas en *T. reesei*.

Las proteínas o enzimas útiles para proporcionar los objetivos de la invención son celulasas de *Trichoderma* y mananasas de *Trichoderma* pero las proteínas de hongo filamentoso secretables más preferidas son las siguientes enzimas, que son homólogas a *Trichoderma*, es decir celobiohidrolasas (CBHI y CBHII), endoglucanasas (EGI y EGII), y mananasa (MANI). Es especialmente útil para la invención un dominio de cola de una celulasa de *Trichoderma*, o un dominio central y de bisagra de una mananasa de *Trichoderma*.

Las secuencias de aminoácidos y ADN de las enzimas y dominios mencionados anteriormente son bien conocidos a partir de la bibliografía y algunos se describen a continuación en los ejemplos de la presente invención. Los especialistas en la técnica pueden, usando dichas secuencias, construir una multitud de vectores de expresión útiles alternativos de acuerdo con los principios expuestos en esta solicitud.

Como el objetivo principal de la invención es la producción de xilanasas originadas por actinomicetes, el vector de expresión recombinante de la presente invención comprende una secuencia de ADN que codifica una xilanasas originada por un actinomicete.

ES 2 301 174 T3

Los ejemplos de dichas secuencias de ADN útiles son aquellas que pueden obtenerse de la secuencia de ADN de *A. flexuosa* SEC ID N° 1 que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 o la secuencia de ADN SEC ID N° 3 que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4 o equivalentes de dichas secuencias de aminoácidos, donde dichos equivalentes tienen una identidad de al menos el 85% a nivel de aminoácidos con la SEC ID N° 2 o la SEC ID N° 4 y una actividad xilanolítica similar a la de la SEC ID N° 2 o la SEC ID N° 4. También se describen a continuación las secuencias de aminoácidos llamadas SEC ID N° 12, SEC ID N° 14, SEC ID N° 16, y SEC ID N° 18 en los ejemplos, representando las secuencias las fusiones entre la región central y de bisagra de MANI y el gen de xilanasas de *A. flexuosa*.

Las secuencias de ADN útiles pueden encontrarse, por ejemplo, en los plásmidos pALK923 (DSM9322), pALK938 (DSM9899), pALK939 (DSM9900), pALK940 (DSM9901), pALK941 (DSM9902) y pALK1056 (DSM9903) que codifican la xilanasas AM35 de *Actinomadura flexuosa* y el plásmido pALK927 (DSM9447) y el plásmido pALK928 (DSM9448) que codifican la xilanasas AM50 de *Actinomadura flexuosa*.

Los promotores preferidos en los vectores de expresión de ADN recombinantes de la presente invención son los de una proteína de hongo filamentosos secretable, más preferiblemente un promotor de *cbh1* de *T. reesei*.

Ejemplos de vectores de expresión recombinantes preferidos son los plásmidos pALK945, pALK948, pALK1021 y pALK1022. El plásmido pALK1022 se muestra en la Figura 17. Las construcciones de los otros tres plásmidos son esencialmente iguales al plásmido pALK1022 con la excepción de que las secuencias de engarce son como las descritas con detalle en los ejemplos, por ejemplo, la SEC ID N° 11, SEC ID N° 13, SEC ID N° 15 y SEC ID N° 17. Dichos vectores de expresión se usan para transformar hongos filamentosos, tales como *Trichoderma*, más preferiblemente *T. reesei*.

Los huéspedes transformados con dichos vectores de expresión producen xilanasas que tienen toda la secuencia de aminoácidos N-terminal SEC ID N° 5, que es idéntica a la secuencia N-terminal (D-T-T-T-I-T-Q) de la xilanasas de *A. flexuosa* de tipo silvestre.

Los huéspedes transformados son capaces de expresar y secretar una o más proteínas o enzimas, preferiblemente xilanasas originadas por actinomicetes en el medio de cultivo durante el cultivo o fermentación.

Después del cultivo y retirada de las células huésped por filtración, centrifugación etc., el medio de cultivo como tal o concentrado proporciona una proteína útil o preparación enzimática, que puede someterse a procedimientos de procesamiento descendente adicionales para estabilidad y capacidad de almacenamiento mejorados. Como alternativa, la preparación puede someterse a aislamiento y purificación para obtener la proteína o enzima deseada originada por bacterias o actinomicetes en forma más purificada.

Ejemplos de procedimientos descendentes útiles del medio de cultivo usado son, por ejemplo, filtración, ultrafiltración, precipitación, centrifugación, secado, evaporación, inmovilización, granulación, etc.

La preparación que contiene enzimas, especialmente xilanasas originadas por actinomicetes y que se pueden obtener cultivando huéspedes transformados con los vectores de expresión de la presente invención son útiles, por ejemplo, para el blanqueado asistido con enzimas porque las enzimas son estables a las temperaturas de procesamiento, cuando las temperaturas de procesamiento están en los intervalos de 50-90°C, preferiblemente 60-85°C, más preferiblemente 70-80°C.

Dichas preparaciones también son útiles para tratar pulpa de papel y para tratar enzimáticamente biomasa vegetal.

Por tanto, la presente invención proporciona un vector de expresión recombinante para producir una preparación que contiene xilanasas de origen actinomicete en un huésped fúngico filamentosos *Trichoderma*, uniendo de forma funcional en dichos vectores de expresión recombinante un promotor a una secuencia de ADN que codifica un dominio de cola de una celulasa de *Trichoderma* o un dominio central y de bisagra de una mananasa de *Trichoderma*, que a su vez contiene, fusionada en fase, una secuencia de ADN que codifica una xilanasas de actinomicetes; después transformando un huésped *Trichoderma* con los vectores construidos de este modo y cultivando dichos huéspedes transformados en un medio de cultivo y en condiciones de cultivo, que son óptimas para la secreción de la enzima. Después del cultivo, las células huésped se separan del medio de cultivo, que puede usarse como una preparación enzimática como tal o en forma concentrada o después de someterse a procedimientos de procesamiento descendente adecuados.

La invención se describe con mayor detalle en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos muestran solamente unas pocas aplicaciones concretas de la invención. Es evidente para los especialistas en la técnica que se pueden crear varias aplicaciones similares.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Cultivos de Matraz en Agitación y Fermentador de *Actinomadura flexuosa* DSM43186

La cepa *A. flexuosa* DSM43186 se sembró en estrías en placa de medio mineral de hojuelas de avena (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH [Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares] *DSM Catalogue of strains*, 3rd ed., Braunschweig, Alemania (1983); 1 litro contiene 20 g de agar, 20 g hojuelas de avena, 1 ml de solución de elementos traza que contienen 100 mg de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ /100 ml; pH 9,0) y se incubó a 50°C hasta la esporulación. Se inoculó una colonia esporulante en 10 ml de medio XPYB (Greiner-Mai, E. y col., *System. Appl. Microbiol.* 9:97-109 (1987); Holtz, C. y col., *Antonie van Leeuwenhoek* 59:1-7 (1991)); 1 litro contiene 5 g de xilano de espelta de avena, 5 g peptona de caseína, 5 g de extracto de levadura, 5 g extracto de carne, 0,74 g de $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; pH 9,0) y se incubó a 55°C en un agitador rotatorio (250 rpm) durante dos a tres días. Después se transfirió un inóculo de 5 ml a 250 ml del mismo medio y se incubó en las mismas condiciones durante tres días. La actividad xilanasa obtenida fue de 17 nkat/ml.

El procedimiento para dos fermentaciones de 1 l (Biostat M, B. Braun, Alemania) se preparó como anteriormente. Se usó inóculo al 10% (v/v) para las fermentaciones. El pH se mantuvo a $\text{pH } 7,8 \pm 0,2$ por la adición de amoníaco (12,5% (v/v)) y ácido fosfórico (17% (v/v)), la temperatura de fermentación fue 50°C. El fermentador se agitó a 400 rpm y el flujo de aire fue 1 l/min. Las actividades xilanasa obtenidas fueron 32 y 58 nkat/ml (medidas a pH 6,0 y 60°C con 5 minutos de tiempo de incubación). Los medios de cultivo de los cultivos se usaron en purificación de proteínas y experimentos de blanqueado.

Las actividades xilanasa en todos los ejemplos se midieron de acuerdo con Bailey, M.J. y col., *J. Biotechnol.* 23: 257-270 (1992) usando xilano de abedul al 1% (p/v) (Roth n° 7500) como sustrato. Las condiciones de ensayo fueron, si no se indica otra cosa, pH 5,3 y 50°C con un tiempo de incubación de 5 minutos. Una unidad xilanasa (1 nkat) se define como la cantidad de enzima que produce la reducción de carbohidratos que tienen una fuerza de reducción correspondiente a un nmol de xilosa en un segundo a partir de xilano de abedul en condiciones de ensayo. La Unidad Internacional (UI) se define como la cantidad de enzima que produce un micromol de producto final medido en un minuto a partir del sustrato polimérico, entonces 1 UI = 16,67 nkat.

Ejemplo 2

35 Determinación del pH y Dependencias de la Temperatura de la Actividad Xilanasa de *Actinomadura flexuosa* a partir del Medio de Cultivo

Para determinar la dependencia del pH para la actividad xilanasa de *A. flexuosa*, las muestras del medio de cultivo del cultivo de matraz en agitación (Ejemplo 1) se diluyeron en tampones de McIlvain 50 mM (ácido cítrico 50 mM - Na_2HPO_4 100 mM) del intervalo de pH 3,0-11,0. Los valores de pH finales de las mezclas de tampón y enzima fueron 3,5, 4,5, 5,4, 6,4, 7,2, 8,0, 8,5, 9,7 y 11,2. La actividad xilanasa se midió en cada pH a 50°C, 5 min. de reacción. La actividad xilanasa mostró un 80-100% de su actividad máxima en el intervalo de pH de aproximadamente 5,4-8,0, que muestra actividad máxima a aproximadamente pH 6,4 (Figura 1).

Para la determinación de la estabilidad térmica, las muestras del sobrenadante de cultivo se diluyeron en tampón de McIlvain 50 mM. Se añadió albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ y se añadieron 10 $\mu\text{g/ml}$ de pepstatina A así como 174 $\mu\text{g/ml}$ de fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF) como inhibidores de proteasa. Los valores de pH final de las mezclas de tampón y enzima fueron 6,9, 7,8 y 9,0. Las muestras se incubaron en ausencia del sustrato a 60°C, 70°C y 80°C. Las muestras se tomaron a intervalos de 0, 30, 60 y 120 minutos y se enfriaron inmediatamente en hielo antes de la determinación de la actividad xilanasa residual a 50°C (5 min. de reacción en el pH correspondiente). La enzima era muy estable cuando se incubaba a 60°C y 70°C; después de 120 minutos de incubación a 70°C a pH 9 se retenía más del 60% de la actividad xilanasa (Figura 2A, 2B y 2C).

Ejemplo 3

55 Purificación de Xilanasas de *Actinomadura flexuosa*

La purificación de xilanasas de medio de cultivo de *A. flexuosa* se realizó a +4°C con columnas cromatográficas acopladas a un aparato de FPLC (Farmacia). Las mediciones de actividad xilanasa se realizaron a 50°C y a pH 6,5. La proteína se controló a 280 nm en toda la purificación. Las muestras se procesaron en geles de bloque de poliacrilamida que contenían SDS al 0,1% en un sistema de electroforesis Bio-Rad Mini Protean II y se tiñeron con Azul Brillante de Coomassie. Se usó un anticuerpo policlonal preparado contra la xilanasa A XynAde *Thermomonospora fusca*, obtenido del Prof. David Wilson, (Cornell University, Nueva York) para detectar la(s) xilanasa(s) de *A. flexuosa* en transferencias de Western. En la detección, se usó un Sistema ProtoBlot AP de Promega.

Se combinó un medio de cultivo de las dos fermentaciones de 1 l descritas en el Ejemplo 1 y se centrifugó a 8.000 g durante 30 min. El sobrenadante (1.500 ml) se diluyó 1 + 2 con Na_2HPO_4 12,5 mM pH 9 y se ajustó a pH 8,6 con NaOH 1 M. Esta muestra se aplicó, en dos series, en un intercambiador de iones de DEAE Sepharose CL-6B

(Pharmacia) (2,5 x 29 cm) equilibrado con Na_2HPO_4 12,5 mM, pH 9, a 100 ml/h. El flujo de las dos realizaciones se combinó y se procesó por separado como se describe a continuación.

La elución de las proteínas unidas de la columna de DEAE (Figura 3) se consiguió por un gradiente lineal (400 ml + 400 ml) de Na_2HPO_4 25 mM pH 9, a Na_2HPO_4 25 mM, pH 9 que contenía NaCl 1 M a un caudal de 105 ml/h y se recogieron fracciones de 10 ml. Pudieron recogerse dos picos que contenían actividad xilanasas (combinación I y II), así como una larga "línea" del segundo pico (combinación III).

Las tres combinaciones (cada una combinada a partir de dos realizaciones con DEAE) se ajustaron para que contuvieran cloruro sódico 2 M cada una y se aplicaron por separado en una columna de Fenil Sepharose CL-4B (Pharmacia) (2,5 x 15 cm) equilibrada con Na_2HPO_4 25 mM, pH 9 que contenía NaCl 2 M. La elución se realizó a 100 ml/h con un gradiente de dos etapas de tampón A al 100% (Na_2HPO_4 25 mM, pH 9) a tampón B al 35% (Na_2HPO_4 25 mM que contenía etilenglicol al 60%) en 60 min. seguido de un gradiente más brusco de B al 35% a B al 100% en 60 min. Se recogieron fracciones de 7 ml (combinación I) o 5 ml (combinaciones II y III). Las fracciones que contenían actividad xilanasas de la combinación I obtenidas se combinaron y llamaron DEPS I (Figura 4A). Ambas combinaciones de DEAE II y III produjeron dos picos que contenían actividad xilanasas llamados DEPS II/1, DEPS II/2 (Figura 4B) y DEPS III/1, DEPS III/2 (Figura 4C), respectivamente.

Las muestras de estas combinaciones se dializaron frente a Na_2PO_4 25 mM, pH 9, durante una noche y se procesaron en SDS-PAGE y se tiñeron para las proteínas con Azul de Coomassie (Figura 5A) así como se analizaron por transferencias de Western con anticuerpo contra *T. fusca* (Figura 5B). El anticuerpo reaccionó solamente con dos a tres bandas de masa molecular más pequeña (35 kDa o inferior) a partir del medio de cultivo y ligeramente con las proteínas en estas combinaciones. Las masas moleculares aparentes de las proteínas en estas combinaciones fueron de 50 kDa estimadas de SDS-PAGE con patrones de masa molecular. Las combinaciones DEPS II/2, DEPS III/1 y DEPS III/2 fueron las más puras.

El flujo del intercambiador de iones de DEAE (véase anteriormente) se concentró con una membrana de límite de 30 kDa. Casi la mitad de la actividad xilanasas se encontró en el concentrado y la mitad en el permeado. Ambos se ajustaron para que contuvieran NaCl 2 M y se aplicaron en una columna de Fenil Sepharose 6 FastFlow (bajo sub; Pharmacia) (2,5 x 34 cm) equilibrada con Na_2HPO_4 25 mM, pH 9, que contenía NaCl 2 M. La elución se consiguió a 300 mlh⁻¹ con el mismo gradiente que se usó para las combinaciones de DEAE en Fenil Sepharose CL-6B y se recogieron fracciones de 10 ml. Los picos que contenían actividad xilanasas obtenidos se llamaron KF1, KF2 y KF3 (Figura 6B). El permeado de la concentración se sometió a una realización idéntica en Fenil Sepharose 6 FastFlow (bajo sub), y las fracciones que contenían actividad xilanasas se llamaron PF1 y PF2 (Figura 6A). Estos picos se dializaron durante una noche frente a Na_2HPO_4 25 mM, pH 9, y se analizaron en SDS-PAGE así como en transferencias de Western (Figura 7A y 7B). El primer pico, KF₁, del concentrado mostró una banda de masa molecular aparente de 40 kDa en SDS-PAGE, pero no mostró reacción en transferencias de Western. Sin embargo, este pico tenía la mayor actividad xilanasas. KF2 mostró una banda de 50 kDa en SDS-PAGE que reaccionaba débilmente con el anticuerpo, pero podía verse una clara banda de 30 kDa en transferencias de Western. El tercer pico, KF3, mostró una banda de 35 kDa en transferencias de Western. El concentrado contenía xilanasas con pesos moleculares aparentes de 50, 40, 35 así como 30 kDa. El primer pico, PF1, del permeado reaccionó con anticuerpo contra *A. fusca* que mostró dos bandas de 35 kDa y 30 kDa, respectivamente. PF2, por otro lado, mostró solamente una banda de 35 kDa en transferencias de Western.

Como resumen, el medio de cultivo de *A. flexuosa* sp. DSM43186 contiene xilanasas con masa molecular de aproximadamente 50 kDa (representada por las combinaciones DEPSII/2, DEPSIII/1 y DEPSIII/2), 40 kDa (representada por la combinación KF1), 35 kDa (representada por las combinaciones PF2 y KF3) y 30 kDa (representada por la combinación KF2). De éstas, las proteínas de 35 kDa y 50 kDa aparecen con las bandas de xilanasas principales (en SDS-PAGE). Es posible que la banda de xilanasas de 40 kDa en SDS-PAGE sea un producto de degradación de la banda de 50 kDa en SDS-PAGE y que la banda de 30 kDa en SDS-PAGE sea un producto de degradación de la banda de xilanasas de 35 kDa en SDS-PAGE.

Ejemplo 4

Producción y Secuenciación de Péptidos de las Xilanasas de 35 kDa y 50 kDa Purificadas

Una muestra (12 ml) de la combinación I de la realización de DEAE Sepharose CL-6B (Fig. 3) se sometió a cromatografía de exclusión en gel sobre una columna HighLoad 26/60 Superdex G75 (Pharmacia) equilibrada con Na_2HPO_4 25 mM, pH 9 a 120 ml/h. Una muestra (25 ml) de la fracción del pico que contiene actividad xilanasas obtenida se diluyó (1 + 1) con agua y se aplicó en un intercambiador de iones mono Q (Pharmacia) con Na_2HPO_4 12,5 mM, pH 9. La elución se realizó a 30 ml/h con un gradiente lineal de Na_2HPO_4 12,5 mM, pH 9 que contenía NaCl 0,5 M en 50 min. El pico que contenía actividad xilanasas (1 ml) se concentró en un micro concentrador Centricon (límite 30 kDa) y se eluyó con bicarbonato de amonio al 1%. Esta muestra concentrada que contenía una única banda de proteína de 50 kDa en SDS-PAGE se evaporó y se alquiló con vinilpiridina. La muestra alquilada se digirió con tripsina (tripsina modificada, sequenal grade, Promega V5111). La digestión se aplicó en una columna de fase inversa acoplada a una HPLC, y se recogieron manualmente los picos que absorbían a 214 nm. Cada fracción recogida se sometió a degradación de Edman en un secuenciador de fase líquida con pulsos de gas (Kalkkinen & Tilgmann, J. Protein Chem. 7:242-243 (1988)) y los aminoácidos PTH liberados se analizaron en línea usando HPLC de orificio estrecho de fase inversa.

ES 2 301 174 T3

Una muestra de xilanasas de 35 kDa purificada (esencialmente purificada como se ha descrito en el Ejemplo 3) se sometió a Degradación de Edman como anteriormente.

Los péptidos obtenidos de la xilanasas de 50 kDa purificada y la secuencia N-terminal de la xilanasas de 35 kDa purificada se enumeran en la Tabla 1.

TABLA 1

Péptidos de xilanasas de 50 kDa purificada y la secuencia N-terminal de la xilanasas de 35 kDa purificada

Péptido	Secuencia
Nº 1696	Ala-Ala-Ser-Thr-Leu-Ala-Glu-Gly-Ala-Ala-Gln-His-Asn-Arg
Nº 1697	Tyr-Phe-Gly-Val-Ala-Ile-Ala-Ala-Asn-Arg
Nº 1698	Leu-Asn-Asp-Ser-Val-Tyr-Thr-Asn-Ile-Ala-Asn-Arg
Nº 1699	Asn/Gly/X-Thr-Gly-Ile-Thr-Val-X-Gly-Val
Nº 1703	His/Glu/Thr-Glu/Phe-Leu/Asn-Val/Ser-Tyr/Val-Asn/Thr-Met/Ala-Val/Glu-Asn/X-Glu/X-Met/X
Nº 1704	Glu-Phe-Asn-Ser-Val-Thr-Ala-Glu-Asn-Glu-Met-(Lys)
N-term 35 kDa	Asp-Thr-Thr-Ile-Thr-Gln

La combinación de las secuencias peptídicas de xilanasas de 50 kDa Nº 1696 (SEC ID Nº 6), Nº 1697 (SEC ID Nº 7), Nº 1698 (SEC ID Nº 8) y Nº 1704 (SEC ID Nº 10) corresponde con una similitud del 75% a los aminoácidos 42-89 de laxilanas A de *Streptomyces lividans* (número de acceso M64551). El péptido Nº 1703 no tiene asignada ninguna SEC ID Nº, a causa de la multitud de alternativas presentes en la secuencia y porque no está reivindicada. Además, el péptido Nº 1699 (SEC ID Nº 9) muestra una similitud del 78% con los aminoácidos 301-309 de XlnA de *S. lividans*:

Actinomadura 50 kDa	nº1696	nº1697	nº1698	nº1704
	1 AASTLAEGAAQHNR	YFGVAIAANR	LNDSVYTNIANR	EFNSVTAENEMK 48
	I.III:..III .I	III.III..I	I.II.II.II.I	III IIIIIII
S. lividans XlnA	42 AESTLGAAAQSGR	YFGTAIASGR	LSDSTYTSIAGR	EFNMVTAENEMK 89
Actinomadura 50 kDa	nº1699			
	G			
	NTGITVXGV			
	IIII:II			
S. lividans XlnA	SRCLGITVWGVRD			
	300 310			

Las secuencias de *S. lividans* están presentes solamente para comparación.

Ejemplo 5

Las Propiedades de pH y Estabilidad a la Temperatura de las Xilanasas de 35 kDa y 50 kDa Purificadas

La estabilidad a la temperatura de las enzimas de 35 y 50 kDa purificadas con o sin 100 µg/ml de BSA se determinó incubando las muestras enzimáticas a 70°C, pH 6,0 durante un periodo de 0, 2, 6 y 24 horas después de que se hubiera determinado la actividad xilanasas de las muestras (a pH 6,5, 60°C, 20 min. de reacción). En las muestras en las que se había añadido BSA, podía medirse más del 80% de la actividad original incluso después de 24 h de incubación (Figuras 8 y 9 para las xilanasas de 35 kDa y 50 kDa, respectivamente). Cuando no se añadía BSA, aún podía medirse aproximadamente el 60% (35 kDa) o el 70% (50 kDa) de la actividad original después de 24 h de incubación (Figuras 8 y 9).

ES 2 301 174 T3

La dependencia del pH se determinó incubando las muestras enzimáticas a diferentes valores de pH (pH 4-8) y a temperaturas de 80°C (35 kDa) y 60, 70 y 80°C (50 kDa) durante 20 minutos (35 kDa) o 10 minutos (50 kDa). A 80°C, la xilanasas de 35 kDa mostró un pH óptimo de aproximadamente pH 6 que tiene casi un 90% de su actividad de aproximadamente pH 5 a 7 (Figura 10A). A 60°C y 70°C, la xilanasas de 50 kDa mostró un pH óptimo de pH 5-7 y a 80°C, un pH óptimo de pH 6-7. La enzima fue muy estable de pH 5-7 en estas condiciones (Figura 10B). La incubación de ambas xilanasas de 35 kDa y 50 kDa a 60°C durante 60 minutos a valores de pH de 4,2 a 8,7 mostró una estabilidad similar a la encontrada en el experimento anterior, excepto en que la xilanasas de 50 kDa parece ser menos estable a pH 4,2 en estas condiciones (Figura 10C). Los experimentos de dependencia de la temperatura a pH 7 con incubaciones de 60 minutos de las xilanasas de 35 kDa y 50 kDa con sustrato a temperaturas de 50, 60, 70 y 80°C mostraron actividad máxima a 70°C para ambas enzimas (Figura 11). La xilanasas de 50 kDa pareció ser, a partir de estos resultados, ligeramente más estable a 80°C y pH 7 que la xilanasas de 35 kDa. Por otro lado, la xilanasas de 35 kDa mostró más actividad y estabilidad en el intervalo de pH de 4-5 (Figuras 10A-10C).

Ejemplo 6

Experimentos de Blanqueado Usando Medio de Cultivo de Actinomadura flexuosa

Los experimentos de blanqueado se hicieron para determinar la utilidad de la actividad xilanasas de *A. flexuosa* en blanqueado tanto ECF (libre de cloro elemental) como TCF (totalmente libre de cloro) de pulpa de papel kraft.

Blanqueado ECF

El medio de cultivo que contenía actividad xilanasas de *A. flexuosa* (Ejemplo 1) se añadió a pulpa de papel kraft de madera blanda deslignificada con oxígeno acabada (número kappa 15) en la cantidad de 50 ó 100 nkat/g de materia seca de pulpa. La actividad xilanasas se midió a pH 6 y 60°C con 5 minutos de tiempo de incubación. La actividad celulasa del medio de cultivo fue muy baja. Los tratamientos enzimáticos se hicieron a pH 7 y 70°C durante una hora. La pulpa de referencia se mantuvo en las mismas condiciones sin adición de enzimas.

Después de los tratamientos enzimáticos, las pulpas se blanquearon en dos fases: fase de dióxido de cloro y extracción alcalina. La absorbancia del filtrado a 280 nm se determinó para estimar la cantidad de lignina disuelta.

Como puede observarse en la Tabla 2, después del pretratamiento con la preparación de xilanasas se retiró más lignina residual de las pulpas que la evidenciada por el aumento de A_{280} de los filtrados y la reducción de números kappa en las pulpas finales. Las pulpas finales tenían también 3-4 unidades de mayor brillo en comparación con la referencia. La resistencia de las pulpas no se vio afectada, porque los valores de viscosidad permanecieron dentro de la variación normal del procedimiento.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 2

Referencia 50 nkat/g 100 nkat/g			
Tratamiento enzimático			
Consistencia, %	3	3	3
Tiempo de retención, horas	1	1	1
Dosificación enzimática, nkat/g	0	50	100
Temperatura, °C	70	70	70
pH, inicio/final	7,0/7,1	7,0/7,2	7,2/7,4
Absorbancia, 280 nm	0,22	0,49	0,65
Fase de ClO₂			
Consistencia, %	3	3	3
Tiempo de retención, horas	1	1	1
Dosificación de ClO ₂ , %	2,3	2,3	2,3
Temperatura, °C	60	60	60
pH al final	2,4	2,5	2,5
Fase de extracción			
Consistencia, %	10	10	10
Tiempo de retención, horas	1	1	1
Dosificación de NaOH, %	1,5	1,5	1,5
Temperatura, °C	70	70	70
pH al final	10,9	10,9	10,9
Pulpa Final			
Brillo, % ISO	56,7	59,9	60,6
Número Kappa	6,6	5,6	5,4
Viscosidad, ml/g	920	910	900

Blanqueado TCF

La pulpa de papel kraft de madera blanda deslignificada con oxígeno acabada (número kappa 15) se trató con preparación de xilanasa de *A. flexuosa* usando dosificaciones enzimáticas de 50 y 100 nkat/g de materia seca de pulpa. La actividad xilanasa se midió a pH 6 y 60°C con 5 minutos de tiempo de incubación. La actividad celulasa de la preparación fue muy baja. Los tratamientos enzimáticos se hicieron a pH 7 y 70°C durante una hora. La pulpa de referencia se mantuvo en las mismas condiciones sin adición de enzima.

Después de los tratamientos enzimáticos las pulpas se blanquearon usando la secuencia QP. Primero se retiraron los metales quelando con EDTA al 0,2% (fase quelante, Q) y después se blanquearon las pulpas con peróxido de hidrógeno (fase de peróxido, P). Los compuestos químicos blanqueantes fueron los siguientes: H₂O₂ al 3%, NaOH al 3%, DPTA al 0,2% (ácido dietileno triamina pentaacético) y MgSO₄ al 0,5%. La absorbancia del filtrado a 280 nm se determinó para estimar la cantidad de lignina disuelta. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

	Referencia 50 nkat/g 100 nkat/g		
5	Tratamiento enzimático		
	Consistencia, %	3,5	3,5
10	Tiempo de retención, horas	1	1
	Dosificación enzimática, nkat/g	0	50
	Temperatura, °C	70	70
15	pH. inicio/final	7,0/7,4	7,0/7,3
	Absorbancia, 280 nm	0,27	0,43
	Fase quelante, Q		
20	Consistencia, %	3,0	3,0
	Tiempo de retención, horas	1	1
25	EDTA % de materia seca	0,2	0,2
	Temperatura, °C	70	70
	pH al final	5,5	5,6
30	Absorbancia, 280 nm	0,24	0,44
	Fase de peróxido, P		
	Consistencia, %	10	10
35	Tiempo de retención, horas	3	3
	Temperatura, °C	80	80
	pH al final	10,6	10,6
40	Dosificación de peróxido, %	3,0	3,0
	Peróxido consumido, %	2,1	2,2
	Pulpa Final		
45	Brillo, %	71,9	72,9
	Número kappa	9,0	8,3
50	Viscosidad, ml/g	870	890

La Tabla 3 muestra que, de acuerdo con los valores de A_{280} medidos y los números kappa, se retiró significativamente más lignina después de los tratamientos con xilanasas en comparación con la referencia. Los valores de viscosidad de las pulpas permanecieron dentro de la variación normal del procedimiento, que significa que la resistencia de las pulpas no se vio afectada. También los valores de brillo fueron mayores que la referencia, pero como se esperaba, el aumento fue más ligero que en blanqueado con dióxido de cloro.

60 Ejemplo 7

Experimentos de Blanqueado Usando las Xilanasas de 35 kDa y 50 kDa Purificadas

La xilanasas mayor de 50 kDa (AM50) y la más pequeña de 35 kDa (AM35) purificadas (incluyendo también la xilanasas de 30 kDa) se ensayaron en un blanqueado con peróxido de tres fases. Las preparaciones enzimáticas purificadas fueron iguales que las usadas en la determinación del pH y las propiedades térmicas de las enzimas purificadas (Ejemplo 5).

ES 2 301 174 T3

Las preparaciones enzimáticas purificadas se añadieron a la pulpa de papel kraft de madera blanda deslignificada con oxígeno acabada (número kappa 13,5 y brillo del 37%) en la cantidad de 100 nkat/g de materia seca de pulpa. La actividad xilanasa se midió a pH 6,5 y 60°C con 5 minutos de tiempo de incubación. Los tratamientos enzimáticos se hicieron a pH 6,5 y 60°C durante una hora. La pulpa de referencia se trató en las mismas condiciones pero sin adición de enzimas. El blanqueado se realizó con la secuencia QP₁P₂P₃. La fase quelante (Q) se realizó añadiendo EDTA al 0,2% de materia seca de pulpa. Las tres fases de peróxido de hidrógeno (P₁P₂P₃) se realizaron todas del mismo modo. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

	Referencia	AM50	AM35
Tratamiento enzimático			
Consistencia, %	3,5	3,5	3,5
Tiempo de retención, horas	1	1	1
Dosificación enzimática, nkat/g	0	100	100
Temperatura, °C, inicio/final	60/59	58/58	60/59
pH, inicio/final	6,6/6,6	6,8/6,8	6,7/6,7
Fase quelante, Q			
Consistencia, %	3,0	3,0	3,0
Tiempo de retención, horas	1	1	1
EDTA, % de materia seca	0,2	0,2	0,2
Temperatura al final, °C	50	49	51
pH al final	4,6	5,4	4,8
Fase P₁			
Consistencia, %	10	10	10
Tiempo de retención, horas	3	3	3
Temperatura, °C	80	80	80
pH inicio/final	12,0/11,7	12,1/12,0	11,9/11,7
Dosificación de peróxido, %	3,0	3,0	3,0
Peróxido consumido, %	2,7	2,7	2,6
Brillo, %	59,6	62,3	63,7
Número kappa	(5-9)	6,3	5,3
Fase P₂			
Consistencia, %	10	10	10
Tiempo de retención, horas	3	3	3
Temperatura, °C	80	80	80
pH, inicio/final	12,2/11,7	12,2/11,7	12,1/11,6
Dosificación de peróxido, %	3,0	3,0	3,0
Peróxido consumido, %	2,2	2,4	2,2
Brillo, %	67,2	69,7	70,7

ES 2 301 174 T3

	Número kappa	6,8	4,8	4,9
	Fase P₃			
5	Consistencia, %	10	10	10
	Tiempo de retención, horas	3	3	3
	Temperatura, °C	80	80	80
10	pH, inicio/final	11,9/12,0	12,0/11,6	12,0/11,8
	Dosificación de peróxido, %	3,0	3,0	3,0
	Peróxido consumido, %	2,1	2,2	2,0
15	Brillo, %	71,3	74,0	74,4
	Número kappa	5,2	4,1	2,2
20	Consumo de peróxido total, %	7,0	7,3	6,8

El uso de AM50 y AM35 aumentó claramente el brillo sin aumentar significativamente la cantidad de peróxido que se consumió. También se redujo el contenido de lignina de las pulpas que se evidencia por la reducción de los números kappa de las pulpas tratadas con estas enzimas.

Ejemplo 8

Aislamiento del ADN Cromosómico y Construcción de la biblioteca Genómica

Se cultivó *Actinomadura flexuosa* DSM43186 en 50 ml de medio que constaba de sacarosa al 10% (p/v), xilano de hojuelas de avena al 0,5% (p/v), peptona de caseína al 0,5% (p/v), extracto de levadura al 0,5% (p/v), extracto de carne al 0,5% (p/v), CaCl₂ x 2H₂O al 0,074% (p/v), pH 7,4-7,5, en matraz en agitación aislado durante 2,5 días a 52°C con agitación a 200 rpm. Se transfirieron 2,5 ml de este cultivo a 50 ml de medio fresco suplementado con glicina al 0,8%, y se cultivó durante 2 días a 50°C, 200 rpm. Las células se sedimentaron por centrifugación y se lavaron con sacarosa al 10%-Tris-HCl 25 mM (pH 8,0)-EDTA 25 mM.

El ADN cromosómico se aisló de acuerdo con Hopwood y col., Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory manual, The John Innes Foundation, Norwich, UK (1985). En resumen, el micelio se lisó con lizozima y mezcla Kirby 2 x (2 g de triisopropilnaftaleno sulfonato sódico, 12 g de 4-amino-salicilato sódico, 5 ml de Tris-HCl 2 M (pH 8,0), 6 ml de fenol saturado con Tris-HCl, compuesta hasta 100 ml con agua). El ADN se precipitó con isopropanol y se disolvió en TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). El ARN se digirió con RNasa.

El ADN cromosómico se digirió parcialmente con *Sau3A* (Boehringer, Alemania) y se fraccionó por tamaño en gradiente de sacarosa (sacarosa al 10-40% (p/v) en NaCl 1 M, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, EDTA 5 mM) procesado a 55.000 rpm durante 6 h a 22°C en la ultracentrífuga Beckman TL-100 en el rotor TLS-55. El gradiente se dividió en fracciones, y aquellas que contenían ADN de principalmente 7-10 kb de tamaño se usaron para construir una biblioteca genómica de *Actinomadura*.

Se usó el Kit de Clonación de Vector *Bam*HI/CIAP ZAP Express™ predigerido (Stratagene; U.S.A.) para construir la biblioteca y se siguieron las instrucciones del fabricante en todas las etapas posteriores. En resumen, se ligaron aproximadamente 200 ng de ADN fraccionado por tamaño en 1 µg de brazos preparados ZAP Express™, y se compactaron usando extracto de compactación Gigapack II (Stratagene, U.S.A.). El título de la biblioteca se determinó infectando células de *E. coli* XL1-Blue MRF con diluciones seriadas del fago de compactación y sembrando en placas NZY. El título total de la mezcla de ligamiento fue aproximadamente 3 x 10⁷ pfu/ml, con una frecuencia de inserción de más del 96%. La biblioteca se usó para explorar sin amplificación.

Ejemplo 9A

Aislamiento del Gen que Codifica la Xilanasas de 35 kDa en Base a la Actividad de Hidrólisis en Placas de RBB-Xilano

La biblioteca genómica de ADN de *Actinomadura flexuosa* DSM43186 en el vector ZAP Express™ se exploró para la actividad xilanólítica, del siguiente modo. El huésped, células Stratagene de *E. coli* XL-Blue MRF⁺ se cultivaron en LB + maltosa al 0,2% (p/v) + MgSO₄ 10 mM y se ajustó a DO₆₀₀=0,5. Las células se infectaron con la biblioteca recombinante durante 15 min. a 37°C y se sembraron con agar NZY sobre las placas NZY. Las placas se incubaron durante 4 horas a 42°C, revestidas con filtros de nitrocelulosa saturados con IPTG 10 mM para inducir la expresión de la proteína *lacZ*, y se incubaron durante una noche a temperatura ambiente.

ES 2 301 174 T3

Los filtros se lavaron con tampón fosfato K 50 mM (pH 6,8), y se transfirieron en placas de RBB-xilano + kanamicina (Km). La placa tiene dos capas; la capa inferior de 15 ml de LB regular + Km (40 µg/ml) y la capa superior de 5 ml de RBB xilano (RBB xilano al 0,5% (p/v), xilano de hojuelas de avena al 1% (p/v) en LB + Km, tamponado con fosfato K 50 mM, pH 6,8). Las placas se transfirieron a 50°C durante una segunda noche para determinar la actividad xilanolítica. Los filtros se retiraron, y el halo transparente en las placas de RBB-xilano + Km reveló los clones que tenían actividad xilanasa. Se cogieron 22 placas positivas de las placas NZY originales en tampón SM/cloroformo.

El vector ZAP Express™ se ha diseñado para permitir la escisión y recircularización *in vivo* simple y eficaz de cualquier inserto clonado contenido en el vector lambda para formar un fagómido que contenga el inserto clonado. En resumen, los clones positivos se incubaron con células XL1 Blue MRF con el fago auxiliar ExAssist. Después de desnaturalización por calor (70°C, 15 min.), y centrifugación, el fagómido escindido pBK-CMV se compactó como partículas de fago filamentosas en el sobrenadante. El fagómido rescatado se mezcló con células XL0LR, y se sembró en LB/kanamicina (50 µg/ml) de acuerdo con el fabricante.

Se volvieron a ensayar las células de *E. coli* XL0LR transformadas con los ADN del fagómido rescatado en RBB-xilano + Km. De los 22 clones originalmente positivos, 12 retuvieron la actividad xilanasa. Los ADN del fagómido se digirieron con *EcoRI-PstI*, se sometieron a electroforesis, se transfirieron a una membrana de nylon, y se hibridaron con un fragmento de xilanasa de *T. fusca* de 1,15 kb marcado con digoxigenina de pALK185 (Fig. 12). El plásmido pALK185 contiene el gen *xynA* de *T. fusca* de pTX101 (Ghangas, G.S. y col., J. Bact. 171:2963-2969 (1994)). Cuatro fagómidos hibridaron con la sonda de ADN de *T. fusca*, lo que indica que llevaban genes(s) que comparte(n) alguna homología con el fragmento de *T. fusca*. Estos fagómidos se denominaron pALK938, pALK939, pALK940 y pALK941. Del ADN cromosómico de *A. flexuosa* DSM43186, la sonda de *xynA* de *T. fusca* hibridó con un fragmento *EcoRI-PstI* de aproximadamente 4 kb.

Ejemplo 9B

Aislamiento del Gen que Codifica la Xilanasa de 35 kDa en Base a la Hibridación con el gen *xynA* de *Thermomonospora fusca*

La biblioteca genómica de ADN de *Actinomadura flexuosa* DSM43186 en el vector ZAP Express se exploró con un fragmento de xilanasa de *T. fusca* de 1,15 kb marcado con digoxigenina de pALK185 (Fig. 12), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se cogieron 17 clones positivos. Los fagómidos se escindieron *in vivo*, como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 9A. Los clones de *E. coli* que albergaban los fagómidos positivos se ensayaron para la actividad xilanolítica en RBB-xilano, como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 9A. Mostraron actividad xilanolítica 11 clones. Se eligió uno de los clones, y el plásmido se llamó pALK1056.

Ejemplo 10

Aislamiento del Gen que Codifica la Xilanasa de 35 kDa en Base a la Producción de Polipéptido reconocido por el Anticuerpo contra XynA de *Thermomonospora fusca*

Se usó el anticuerpo policlonal contra la xilanasa de *T. fusca* de 32 kDa, XynA (Véase el Ejemplo 3), para explorar la biblioteca genómica de *Actinomadura flexuosa* DSM 43186. Se cultivaron células Stratagene XL1-Blue MRF' en LB + maltosa al 0,2% + MgSO₄ 10 mM y se diluyeron a DO₆₀₀=0,5. Las células se infectaron con la biblioteca recombinante durante 15 min. a 37°C y se sembraron con agar superior NZY en las placas NZY. Las placas se incubaron durante 3,5 horas a 42°C, se revistieron con filtros de nitrocelulosa saturados con IPTG 10 mM, y se incubaron durante una noche a temperatura ambiente. La detección se realizó con el anticuerpo contra XynA de *T. fusca* diluido 1:1500 usando el Sistema ProtoBlot AP de Promega. Doce clones positivos, de los que el clon 1.1 dio claramente la señal más fuerte, se cogieron en tampón SM/cloroformo, y se purificaron con una segunda ronda de exploración.

Los fagómidos se escindieron *in vivo*, como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 9A. Los fagómidos después se digirieron con *EcoRI* y *PstI*, se sometieron a electroforesis, se transfirieron en una membrana de nylon y se hibridaron con un fragmento de xilanasa de *T. fusca* de 1,15 kb marcado con digoxigenina de pALK185 (Fig. 12). Del ADN cromosómico de *A. flexuosa* DSM43186, la sonda de *xynA* de *T. fusca* hibridó con un fragmento *EcoRI-PstI* de aproximadamente 4 kb. Los clones también se ensayaron para la actividad xilanolítica en RBB-xilano, como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 9A. Un clon (clon 1.1) fue positivo en ambas exploraciones. El fagómido transportado por este clon se llamó pALK923.

Ejemplo 11

Análisis de Enzimas de Restricción y Secuenciación del Gen de Xilanasa que Codifica la Proteína de 35 kDa

Los plásmidos pALK938 (DSM9399), pALK939 (DSM9900), pALK940 (DSM9901), pALK941 (DSM9902), pALK1056 (DSM9903) y pALK923 (DSM9322) se analizaron por análisis de enzimas de restricción, y se usaron para la secuenciación del gen de la xilanasa. El ADN se secuenció usando kits ABI (Applied Biosystems, U.S.A.) basados en los cebadores T3 y T7 marcados con fluorescencia, o cebadores específicos de secuencia con didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia, por el protocolo de secuenciación de ciclo de cebador con colorante Taq de acuerdo con las instrucciones del proveedor. A causa del elevado contenido de GC en el ADN de *A. flexuosa*, las reacciones de

ES 2 301 174 T3

secuenciación se realizaron con DMSO al 10% (v/v) a la temperatura de hibridación de 58-60°C. Las reacciones de secuenciación se analizaron en el secuenciador ABI 373A, y las secuencias obtenidas se caracterizaron usando el Paquete de Software de Análisis de Secuencia de Genetics Computer Group, versión 7.2. La secuencia de ADN que codifica la xilanasa de 35 kDa se presenta en la Figura 13. La secuencia muestra una ORF (fase de lectura abierta) de 1035 pb, que predice un polipéptido de 344 aminoácidos, y que corresponde a una proteína con un peso molecular de aproximadamente 37,5 kDa. Se encuentra un supuesto sitio de procesamiento de señales después de la alanina 43, y la proteína madura predicha tiene un peso molecular calculado de aproximadamente 32,9 kDa. Los datos de secuencia, por tanto, están de acuerdo con los resultados de purificación y secuenciación de la xilanasa de 35 kDa descritos en los Ejemplos 3 y 4. La secuencia del gen de 35 kDa parecía idéntica en todos los clones ensayados, excepto en el ADN de pALK923. pALK923 contenía 93 pb de secuencia desconocida en el extremo N-terminal del inserto, después de la cual comenzaba la secuencia del gen de la xilanasa de 35 kDa de *A. flexuosa* en la localización correspondiente al par de bases 411 en la Figura 13.

La secuencia muestra elevada homología con xilanasas de diferentes organismos. A nivel aminoacídico, el gen muestra una identidad del 76% con la XynA de *T. fusca*. Además, la xilanasa de 35 kDa de *A. flexuosa* muestra una identidad del 81% con el dominio de unión a xilano de la XynA de *T. fusca* (Irwing y col., Appl. Env. Microbiol.60:763-770 (1995)). Por tanto, la xilanasa de 35 kDa de *A. flexuosa* contiene un dominio de unión a xilano diferente separado del dominio catalítico por una región de engarce que muestra una identidad de sólo aproximadamente el 40% con la región de engarce de XynA de *T. fusca*.

Ejemplo 12

Aislamiento del Gen de Xilanasa de 50 kDa de *Actinomadura flexuosa*

La biblioteca genómica de ADN de *A. flexuosa* DSM43186 en el vector ZAP Express™ se exploró usando una sonda de ADN.

Se diseñaron cebadores oligonucleotídicos en base a las secuencias peptídicas derivadas de la proteína de 50 kDa purificada. Las secuencias cebadoras se presentan en la Tabla 5. Como la combinación de las secuencias peptídicas N° 1696 (SEC ID N° 6), N° 1697 (SEC ID N° 7), N° 1698 (SEC ID N° 8) y N° 1704 (SEC ID N° 10) corresponde con una similitud del 75% a los aminoácidos 42-89 de la xilanasa A de *Streptomyces lividans*, se sintetizó un oligo antisentido de 39 pb, de las bases 331 a 369 en la secuencia de *xlnA* de *S. lividans*. La sonda de *xlnA* de 331-369as de *S. lividans* y los cebadores N° 1704 (SEC ID N° 10), N° 1703as y N° 1696s se marcaron con digoxigenina y la transferasa terminal, y se usaron como sondas en hibridación a 50°C de acuerdo con Boehringer, DIG DNA Labeling and Detection Nonradioactive, Applications Manual.

La sonda N° 1704as y la sonda de *xlnA* de 331-339as de *S. lividans* reconocieron el mismo fragmento *EcoRI-PstI* de 1,0 kb en el ADN de *A. flexuosa*. El fragmento es diferente del fragmento de 4 kb reconocido por la sonda de *xynA* de *T. fusca* (Véase el Ejemplo 9A). En base a estos resultados, se usó la sonda de *xlnA* de 331-369as de *S. lividans* para explorar la biblioteca de *A. flexuosa* para el gen que codifica la xilanasa de 50 kDa.

Se cogieron tres placas positivas después de una detección de una noche. Estos clones se llamaron Act.xyl.50/13, Act.xyl.50/14 y Act.xyl.50/15.

Los fagómidos que contienen el inserto de *A. flexuosa* clonado se escindieron como se ha descrito en el Ejemplo 9A. Para determinar la actividad xilanasa, se sembraron en estrías los clones de *E. coli* en placas de RBB-xilano + Km como se ha descrito en el Ejemplo 9A, usando la cepa que produce la xilanasa de 35 kDa de *A. flexuosa* (del plásmido pALK923) como control positivo. Los clones Act.xyl.50/13 y Act.xyl.50/14 mostraron actividad xilanasa, lo que da un halo transparente alrededor de la colonia.

TABLA 5

*Cebadores oligonucleotídicos usados en la detección del gen que codifica la xilanasa de 50 kDa de *A. flexuosa**

Cebador	Secuencia de ADN
<i>Actinomadura</i> sp. DSM43186	
N° 1696s	GCA/C/G/TGCA/C/G/TCAA/G/CAC/TAAC/TA/CG
N° 1703as	ACCATA/GTTA/GTAA/C/G/TACA/C/G/TA
N° 1704as	TTCATC/TTCA/GTTC/TTCA/C/G/TGC
<i>S. lividans xlnA</i> 331-369as	CGTGAGTTCAACATGGTGACGGCCGAGAACGA GATGAAG

S. lividans xlnA 257-284s AGAGCGGCCGCTACTTCGGCACCGCCAT
S. lividans xlnA 530-561as CACGCCGTTGATGTGGTCGATCATCGCCTGGC

s = con sentido; as = antisentido

Ejemplo 13

Secuenciación del Gen para la Proteína Xilanasa de 50 kDa de *Actinomadura flexuosa*

Los ADN de fagómido del Act.xyl.50/13 y Act.xyl.50/14 se llamaron pALK927 y pALK928, respectivamente. El oligómero de 331-369as de *xlnA* de *S. lividans* se usó para secuenciar el inserto de *A. flexuosa*. Además, se sintetizaron dos oligómeros correspondientes a los nucleótidos 257-284 y 530-561 en la secuencia de *xlnA* de *S. lividans*, así como cebadores específicos de secuencia, para obtener la secuencia del inserto clonado. Las reacciones de secuenciación se realizaron con DMSO al 10% (v/v), a la temperatura de hibridación de 58°C. La secuenciación se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 11. La secuencia de las 1864 pb del gen de la xilanasa de 50 kDa de *A. flexuosa* DSM43186 se presenta en la Figura 14. Las secuencias peptídicas de la proteína de 50 kDa purificada se indican por subrayado de la secuencia de aminoácidos derivada. La secuencia peptídica derivada muestra una identidad del 70-71% con las proteínas xilanasa II de *Actinomadura* sp. FC7 (Figura 15A) y la xilanasa A de *S. lividans* (Figura 15B). La secuencia muestra una ORF de 1479 pb, que predice un polipéptido de 492 aminoácidos, que corresponde a una proteína con un peso molecular de aproximadamente 53,5 kDa.

Ejemplo 14

Producción de Enzimas Bacterianas (*Actinomicetes*) en *Trichoderma reesei*: Producción de Xilanasa de *Thermomonospora fusca* sin una Fusión

Se construyó el casete de expresión pALK193 (Fig. 16) para la expresión del gen de xilanasa de *T. fusca*, *xynA* (Ghangas y col., J. Bacteriol. 171:2963-2969 (1989); Irwin y col., Appl. & Environ. Microbiol. 60:763-770 (1994)) en *T. reesei*. En el casete de expresión, se fusionó el gen de xilanasa de *T. fusca* con la secuencia señal de la celobiohidrolasa 1 (*cbh1*) de *T. reesei* que está precedida por el promotor de *cbh1*. El casete de expresión de 9,4 kb pALK193 se cortó de la estructura del vector por la enzima de restricción *EcoRI*. Después se aisló, se purificó y se introdujo por transformación en la cepa *T. reesei* ALKO2221.

El fragmento de expresión pALK193 contiene:

*El promotor de *cbh1* y la secuencia señal de *T. reesei*: La secuencia promotora de aproximadamente 2,2 kb se obtuvo del plásmido pAMH110 (documento EP 244 234 - Fig. 15) y se aisló originalmente de *T. reesei* cepa VTT-D-80133 (Teeri y col., Bio/Technol. 1: 696-699 (1983)). La secuencia de la secuencia señal y el área promotora que precede el ATG se publicó por Shoemaker y col., Bio/Technology 1: 691-696 (1983). En *T. reesei* cepa VTT-D-80133 la secuencia que precede el ATG es CCGCGGACTGCGCATC (está subrayado un sitio *SacII*, está en negrita una citosina adicional en la secuencia de ADN, en comparación con la secuencia de Shoemaker y col. Bio/Technology 1:691-696 (1983)).

Para hacer una fusión exacta del gen *xynA* de *T. fusca* con la secuencia señal *cbh1*, se sintetizaron los 12 nucleótidos después del sitio *SfiI* en la secuencia señal *cbh1* y el extremo 5' del gen de xilanasa de *T. fusca* (al sitio *MluI* interno, véanse las Fig. 12 y 16) usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

*El gen de xilanasa de *T. fusca* (*xynA*): La clonación del gen *xynA* está publicada en Ghangas y col., J. Bacteriol. 171: 2963-2969 (1989), y la secuencia del gen está publicada en Irwin y col., Appl. & Environ. Microbiol. 60:763-770 (1994). La secuencia que codifica la enzima madura se fusionó (fusión exacta) con la secuencia señal *cbh1*. Una región de terminación de *xynA* de aproximadamente 0,7 kb, para el sitio *SmaI* después de codón STOP de la región codificante de *xynA*, precede el fragmento de terminación de *cbh1* en la construcción.

* El terminador *cbh1* de *T. reesei*: El fragmento de terminación *AvaII* de 0,7 kb que comienza 113 pb antes del codón STOP del gen *cbh1* se añadió después del gen *xynA* de *T. fusca*, para asegurar la terminación de la transcripción. El fragmento terminador derivaba del plásmido pAMH110 (originalmente aislado de *T. reesei* cepa VTT-D-80133; Teeri y col., Bio/Technol. 1: 696-699 (1983)) y contiene tres codones TAA en todas las fases de lectura precediendo el fragmento terminador (desde el sitio *NdeI*, véase el documento EP 244 234).

El gen *amdS* de *A. nidulans*: El gen se ha aislado de *Aspergillus nidulans* VH1-TRSX6. Codifica la acetamidasa (Hynes y col., Mol. Cell. Biol. 3:1430-1439 (1983)). La acetamidasa posibilita que la cepa crezca usando acetamida como la única fuente de nitrógeno y esta característica se usó para seleccionar los transformantes. El fragmento de 3,1 kb (*SpeI*-*XbaI*) del plásmido p3SR2 (Kelly y Hynes, EMBO J. 4: 475-479 (1985)) se usa en los plásmidos. El fragmento contiene 1007 pb del área promotora, 1897 pb de la región codificante (intrones incluidos) y el área terminadora de 183 pb del gen *amdS*.

El fragmento 3' de *cbh1* de *T. reesei*: El fragmento se aisló de *T. reesei* ALKO2466 usando rescate de plásmido (1,7 kb, *BamHI-EcoRI*, que comienza 1,4 kb después del codón STOP del gen, Suominen y col., "High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei* II. Effects of deletions of individual cellulase genes", Mol. Gen. Genet. 241: 523-530 (1993)).

La cepa ALKO2466 deriva de la cepa ALKO233 (Harkki y col., Enzyme Microb. Technol. 13: 227-233 (1991)). El fragmento 3' se usa junto con el área promotora (descrita anteriormente) para dirigir el gen *xynA* de *T. fusca* al locus *cbh1* por recombinación homóloga.

Se usaron procedimientos de ADN convencionales para la construcción de los vectores (Sambrook y col., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989). Las enzimas de restricción, ADN ligasa T4, fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, ADN polimerasa T4, polinucleótido quinasa y la polimerasa *Taq* eran de Boehringer (Alemania) y New England Biolabs (U.S.A.). Cada enzima se usó de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El ADN plasmídico se aisló usando columnas Qiagen (Qiagen GmbH, Alemania) o Promega Magic Minipreps (Promega, U.S.A.) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Los oligonucleótidos usados en las reacciones de PCR y en reacciones de secuenciación se sintetizaron por un Sintetizador de ADN 381A de ABI (Applied Biosystems, U.S.A.). La secuenciación de ADN se hizo usando kits ABI basados en cebadores marcados con fluorescencia, o cuando se usaron cebadores específicos de secuencia, sobre didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia, por el procedimiento de secuenciación de ciclo *Taq* de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las reacciones de secuenciación se analizaron en un secuenciador ABI 373A.

Los fragmentos de ADN para clonar o transformaciones se aislaron de geles de agarosa de bajo punto de fusión (FMC Bio-products, U.S.A.) por el procedimiento de congelación-descongelación de fenol (Benson, Biotechniques 2:66-58 1984) o usando el Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Alemania), los GeneClean^R o Mermaid KitsTM (Bio 101 Inc., U.S.A.) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

T. reesei ALKO2221 se transformó con el casete de expresión *EcoRI* de 9,4 kb aislado de pALK193 (Fig. 16) como se describe por Penttilä y col., Gene 61:155-164 (1987) con las modificaciones descritas en Karhunen y col., Mol. Gen. Genet 241: 515-522 (1993). Los transformantes de *T. reesei* se transfirieron en un medio selectivo y se purificaron a través de los conidios. Los transformantes se estabilizaron cultivándolos en medios selectivos durante dos generaciones antes de la esporulación en agar de dextrosa de patata.

Los sobrenadantes de cultivo de los transformantes se analizaron midiendo la actividad xilanasa producida, procesando las muestras en SDS-PAGE y realizando transferencias de Western. El anticuerpo policlonal contra la xilanasa de *T. fusca* y la xilanasa de *T. fusca* purificada usado en las transferencias de Western se obtuvieron del Prof. David Wilson (Cornell University, Nueva York).

La actividad xilanasa de los sobrenadantes de cultivo se midió a 6,5, 60°C y con 5 minutos de tiempo de incubación. Antes del ensayo, los sobrenadantes se incubaron a 60°C durante 20 horas en tampón de McIlvain 50 mM con 200 µg/ml de BSA para destruir la propia actividad xilanasade *T. reesei*. La actividad xilanasa del sobrenadante de *T. fusca* estuvo inalterable en la incubación de 20 horas usada antes de la reacción pero la incubación usada destruyó la actividad xilanasa del huésped. La actividad xilanasa producida por los mejores transformantes pALK193 fue de aproximadamente 900 nkat/ml.

La xilanasa de *T. fusca* producida por los transformantes de *T. reesei* no fue detectable en SDS-PAGE pero se detectó en las transferencias de Western. La cantidad de xilanasa de *T. fusca* producida por los transformantes, en base a la estimación de las transferencias de Western cuando se purificó la xilanasa de *T. fusca* usada como control, fue de aproximadamente 50-100 mg/l.

Ejemplo 15

Producción de Enzimas Bacterianas (Actinomicetes) en Trichoderma reesei: Producción de Fusiones de β-mananasa de Trichoderma reesei y Xilanasa de Actinomadura flexuosa

Las cepas de *Trichoderma reesei* se construyeron para la producción de xilanasa de *Actinomadura flexuosa* (xilanasa de 35 kDa, AM35). Las cepas producen en exceso xilanasa de *A. flexuosa* y son incapaces de producir endoglucanasa II y celobiohidrolasa I de *T. reesei*. Dichas preparaciones deficientes en actividad celulolítica, y la preparación de las mismas por procedimientos de ADN recombinante, se describen en el documento US 5.298.405 o Suominen y col., Mol. Gen. Genet. 241:523-530 (1993). Para la sobreproducción de xilanasa de *A. flexuosa*, se fusionó el gen *am35* a la región central/bisagra del gen de la mananasa 1 de *T. reesei* y la fusión génica se expresó a partir del promotor fuerte de *cbh1*. Se añadieron diferentes sitios de escisión de proteasas entre las secuencias codificantes de la mananasa y la xilanasa.

Los plásmidos pALK945, pALK948, pALK1021 y pALK1022 (Fig. 17) contienen las secuencias SEC ID N° 11, SEC ID N° 13, SEC ID N° 15 y SEC ID N° 17, respectivamente. Los plásmidos se usaron en la construcción de las cepas superproductoras de xilanasa de *A. flexuosa* y son por lo demás idénticos entre sí, excepto en que difiere la fusión entre las secuencias central/bisagra de *man1* y *am35* (véase la Fig. 19, y a continuación).

ES 2 301 174 T3

Los plásmidos pALK945, pALK948, pALK1021 y pALK1022 contienen los siguientes elementos:

* el promotor de *cbh1* (celobiohidrolasa 1): El promotor es de *Trichoderma reesei* VTT-D-80133 (Teeri y col., Bio/Technology 1: 696-699 (1983)). Se usa el fragmento *EcoRI*- *SacII* de 2,2 kb (Karhunen y col., Mol. Gen. Genet. 241: 515-522 (1993)) en las construcciones. La secuencia que precede el ATG se publicó por Shoemaker y col., Bio/Technology 1: 691-696 (1983)). En la cepa de *T. reesei* VTT-D-80133 la secuencia que precede el ATG es **CCGCGGACTGCGCATC** (el sitio *SacII* está subrayado, una citosina adicional en la secuencia de ADN, en comparación con la secuencia de Shoemaker y col. Bio/Technology 1: 691-696 (1983), está en negrita).

Para hacer una fusión exacta, se sintetizaron los 10 nucleótidos del promotor, desde el sitio *SacII* hasta el ATG, y el extremo 5' del gen *man1* (hasta el sitio *Clal* interno, véase la Fig. 17) usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

* la región central/bisagra del gen *man1*: El gen *man1* codifica la β -mananasa que degrada mananos/glucomananos (Stålbrand y col., Appl. Environ. Microbiol. 61:1090-1097 (1995)). El gen se ha aislado de *T. reesei* QM6a y se conoce su secuencia (Stålbrand y col., 1995). El fragmento de ADN de 1,35 kb de los nucleótidos 1 a 1346 que codifica la región central/bisagra de *man1* (aminoácidos 1 a 379) se usó en los plásmidos pALK945 y pALK948. El fragmento de ADN de los nucleótidos 1 a 1359 (aminoácidos 1 a 383) se usó en los plásmidos pALK1021 y pALK1022. La región central/bisagra de *man1* se unió, a partir de su extremo C-terminal, al gen *am35* usando el procedimiento de PCR para obtener cuatro fusiones diferentes.

* el gen *am35*: La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida del gen *am35* que codifica una xilanasa de 35 kDa se presenta en la Fig. 13. El gen se clonó a partir de una biblioteca genómica de *Actinomadura flexuosa* DSM43186 usando un ensayo de actividad de placa (Ejemplo 9A). Se usó un fragmento de 1,3 kb del nucleótido 542 (la Asp44 N-terminal) al sitio *MluI* aproximadamente 250 pb después del extremo del gen (pALK1055, Fig. 18) en todos los plásmidos. El gen se unió, a partir de su extremo N-terminal, a la secuencia central/bisagra de *man1* usando cuatro fusiones diferentes.

* las fusiones central/bisagra de *man1* - *am35*: se fusionó la región central/bisagra de *man1* a la AM35 con o sin una secuencia engarzadora KEX, marcada como ...KR..., que representa ...Lys-Arg... en la siguiente lista. La fusión se hizo por PCR y se formaron las siguientes secuencias de aminoácidos (véase la Fig. 19 para las secuencias de ADN):

central/bisagra *man1* + secuencia sintética + secuencia *am35*

pALK945	...PLYGRDTT...	= R adicional
pALK948	...PLYGRDKRDTT...	= engarce KEX2 añadido
pALK1021	...PLYGQCGGDTT...	= sin nuevos aminoácidos
pALK1022	...PLYGQCGGRDKRDTT...	= engarce KEX2 añadido

Se introdujo un sitio de restricción *NruI*(TCGCGA) en los engarces pALK945 y pALK948 para ayudar a la construcción del enlace entre las dos secuencias. Esto se hizo cambiando el codón nativo que codifica la glicina 379 en la región central/bisagra de *man1* (GGC) con un codón sintético (GGT) y seleccionando el codón **CGC** para arginina. La Asp44 N-terminal del *am35* está codificada por **GAC**.

Las secuencias de fusión se secuenciaron para asegurar que no hubieran tenido lugar alteraciones no deseadas.

La secuencia engarce usada en el plásmido pALK945 se ha usado en la producción del anticuerpo IgG1 murino anti-2-feniloxazolona a partir de *T. reesei* como una fusión con la región central/bisagra de la celobiohidrolasa I (documento WO 92/01797; Nyssönen y col., Bio/Technology 11: 591-595 (1993)). Las fusiones se escindieron a una baja frecuencia por una proteasa extracelular de *T. reesei*, hasta ahora no caracterizada. La escisión se hizo después del resto de tirosina en la región engarce CBHI, dos aminoácidos antes del auténtico extremo N-terminal de la cadena Fd de cadena pesada.

Las secuencias engarzadoras en los plásmidos pALK948 y pALK1022 llevaban un péptido espaciador sintético, que contenía una señal de procesamiento de proteínas tipo KEX2, que precede la xilanasa de *Actinomadura* madura.

* el terminador de *cbh1*: El fragmento *AvaII* de 739 pb (Karhunen y col., Mol. Gen. Genet. 241:515-522 (1993)) que comienza 113 pb antes del STOP del gen *cbh1* se añadió después del gen *am35* para asegurar la terminación de la transcripción.

* el gen *amdS*: El fragmento que contiene el gen *amdS* era igual al usado en la construcción del plásmido de expresión de *xynA* de *T. fusca*, véase el Ejemplo 14.

* el fragmento 3' de *cbh1*: El fragmento era igual que el usado en la construcción del plásmido de expresión de *xynA* de *T. fusca*, véase el Ejemplo 14. El fragmento 3' se usa junto con el área promotora (descrita anteriormente) para dirigir la fusión génica *man1-am35* al locus *cbh1* por recombinación homóloga.

Se describen procedimientos de ADN convencionales usados en la construcción de los vectores pALK945, pALK948, pALK1021 y pALK1022 en el Ejemplo 16. El casete de expresión de 10,3 kb se cortó de la estructura del vector por restricción con *EcoRI*. Los casetes de expresión después se aislaron, se purificaron y se transformaron en ALKO3620 como se describe en el Ejemplo 16, pero pueden usarse otras cepas de *Trichoderma* como huéspedes también.

En la cepa huésped ALKO3620 se ha remplazado el gen de la endoglucanasa 2 (*egl2*) por el fragmento BglII - XbaI de 3,3 kb del plásmido pAN8-1 (Mattern y col., Fungal Genet. Newlett. 35: 25 (1988)). Este fragmento contiene un gen marcador de transformación, *ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* (Drocourt y col., Nucl. Acids Res. 18:4009 (1990)). El gen *ble* confiere resistencia a varios antibióticos, por ejemplo bleomicina y, en la construcción, se expresa a partir del promotor de *gpdA* (gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa) de *Aspergillus nidulans*, se usa el terminador de *trpC* de *A. nidulans* para terminar la transcripción. El reemplazo se hizo usando los procedimientos de ADN recombinante descritos en el documento US 5.298.405.

Ejemplo 16

Características de los Transformantes Productores de Xilanasa de Actinomadura flexuosa

Se cultivaron varios transformantes *amdS* purificados en matraces de agitación en un medio que contenía suero al 4%, fuente de nitrógeno compleja al 1,5% derivada de cereal, KH_2PO_4 al 1,5% y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 0,5%. Los cultivos se mantuvieron a 30°C y 250 rpm durante 7 días. Se cultivó *A. flexuosa* en un fermentador de 1 l como se ha descrito en el Ejemplo 1.

Los sobrenadantes de cultivo se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE). Se detectó CHBI por transferencia de Western e inmunotinción usando un anticuerpo monoclonal específico para CBHI (CI-258 (Aho y col., Eur. J. Biochem. 200: 643-649 (1991)) y el sistema AP de transferencia de Western ProtoBlot (Promega, U.S.A.) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Algunos de los transformantes CBHI negativos se eligieron para caracterización adicional: por ejemplo las cepas de *T. reesei* recombinantes ALKO3620/pALK945/8, ALKO3620/pALK945/6, ALKO3620/pALK948/27, ALKO3620/pALK1021/4 y ALKO3620/pALK1022/29 no contienen el gen *cbh1*. El gen *cbh1* se reemplaza por el gen marcador *amdS* y la construcción de fusión *man1-am35* en los casetes de expresión pALK945, pALK948, pALK1021, pALK1022. El reemplazo del gen *cbh1* se verificó en hibridaciones de Southern. La cepa huésped ALKO3620 usada en las transformaciones es deficiente del gen *egl2* (véase el Ejemplo 15) Por tanto, las cepas no producen los componentes EGII y CBHI de la celulasa de *Trichoderma*.

Las actividades xilanasa se midieron a pH 5,3 y 50°C, con un tiempo de incubación de 5 minutos en tampón Na_2HPO_4 50 mM y pH 7 y 70°C, con un tiempo de incubación de 5 minutos en tampón de McIlvain 50 mM, que contiene 100 $\mu\text{g/ml}$ de BSA. La actividad xilanasa de un transformante por cada transformación se presenta en la Tabla 6. Los niveles de producción correspondientes de los transformantes estimados a partir de la actividad específica de la xilanasa AM35 de *A. flexuosa* purificada (18.000 BXU/mg a pH 7,0 y 70°C) se muestran en la Tabla 6. Se realizó otro cultivo en matraz de agitación que contenía dos transformantes *cbh1* negativos obtenidos a partir de la transformación pALK945. Las actividades xilanasa se midieron a pH 7, 70°C con un tiempo de incubación de 60 minutos. Los resultados se presentan en la Tabla 6.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 6

La actividad xilanasa y nivel de producción estimado de transformantes de *T. reesei* que producen la xilanasa de 35 kDa de *A. flexuosa*

xilanasa	BXU/ml (pH 5,3, 50°C, 5 min.)	BXU/ml (pH 7, 70°C, 60 min.)	BXU/ml (pH 7, 70°C, 5 min.)	AM35 g/l (estimado)
Medio de cultivo de <i>A. flexuosa</i>	190	ND	440	0,02*
ALKO3620	3560	10	360	0
ALKO3620/pALK945/6	ND	6230	ND	ND
ALKO3620/pALK945/8	10970	8350	14970	0,83
ALKO3620/pALK948/27	6690	7010	11920	0,66
ALKO3620/pALK1021/4	8400	6630	9800	0,54
ALKO3620/pALK1022/29	7940	7410	14870	0,83
* Actividad xilanasa total en medio de cultivo de <i>A. flexuosa</i> .				

La actividad xilanasa de la cepa huésped de *T. reesei* ALKO3620 es aproximadamente diez veces inferior en condiciones óptimas para la proteína AM35 (pH 7 y 70°C) que en las condiciones óptimas para la xilanasa de *T. reesei* (pH 5,3, 50°C). La actividad y nivel de producción más bajos se obtuvieron con un transformante que contenía una construcción de fusión sin ningún sitio de procesamiento para proteasas (ALO3620/pALK1021/4).

Para la determinación de la estabilidad térmica, las muestras de los sobrenadantes de cultivo se diluyeron en tampón de McIlvain 50 mM. Se añadió BSA como proteína vehículo a la concentración de 100 µg/ml. La actividad xilanasa se midió incubando las muestras enzimáticas a 70°C, pH 7,0 durante un periodo de 0, 15, 30 y 120 minutos después de que se determinara la actividad xilanasa de las muestras a pH 7, 70°C, usando un tiempo de reacción de 5 minutos. Los resultados se muestran en la Figura 20. La estabilidad térmica de la proteína AM35 producida por las cepas recombinantes de *T. reesei* transformadas con los plásmidos pALK945 y pALK1022 fue idéntica a la xilanasa de *A. flexuosa*. La proteína AM35 producida por los transformantes pALK948 y pALK1021 fue menos estable (Figura 20).

Las muestras de los sobrenadantes de cultivo se procesaron en geles de bloque de poliacrilamida que contenían SDS al 0,1% en el sistema de electroforesis Bio-Rad Mini Protean II. Se usó un anticuerpo policlonal preparado contra la β-mananasa purificada (pI 5,4) de *T. reesei* RutC30 (Stalbrand y col., Appl. Environ. Microbiol. 61:1090-1097 (1995)) para detectar la mananasa en transferencias de Western. En la detección, se usó el Sistema ProtoBlot AP de Promega. El resultado de Western se muestra en la Fig. 21. El peso molecular de la proteína β-mananasa en el medio de cultivo de la cepa huésped ALKO3620 (carril 5) y de todos los transformantes (carriles 6-10) es algo mayor que el de la muestra proteica de β-mananasa de 53 kDa purificada (Stalbrand y col., J. Biotechnol. 29: 229-242 (1993)), (carriles 2 y 3). Además de la β-mananasa nativa, los transformantes ALKO3620/pALK945/8, ALKO3620/pALK945/6, ALKO3620/pALK948/27 y ALKO3620/pALK1022/29 (carriles 6-9) producen una proteína más pequeña (de aproximadamente 50 kDa) que reacciona con el anticuerpo policlonal contra mananasa. Esta banda representa la proteína mananasa acortada obtenida de las construcciones de fusión, y muestra que las proteasas extracelulares han procesado la fusión. En la cepa ALKO3620/pALK1021/4 (carril 10) se obtienen dos bandas con pesos moleculares de aproximadamente 70 y 80 kDa. Estas bandas se originan de la proteína de fusión no procesada (central/bisagra de MANI + proteína madura AM35).

Los sobrenadantes de cultivo se analizaron también con un anticuerpo policlonal producido contra la xilanasa de 35 kDa purificada de *A. flexuosa* (Ejemplo 18). El resultado se presenta en la Figura 22. Los transformantes ALKO3620/pALK945/6, ALKO3620/pALK948/27 y ALKO3620/pALK10 22/29 mostraron de una a dos bandas principales en las transferencias de Western. Se estimó que estas bandas eran de 37-39 kDa y migraban paralelas a la xilanasa de 35 kDa purificada de *A. flexuosa*. En otro transformante obtenido de la transformación con el casete de expresión pALK945, la banda principal tenía un peso molecular de 31 kDa. El transformante ALKO3620/pALK1021/4 mostró dos bandas de proteína de aproximadamente 70-80 kDa que se correlacionaban con el peso molecular de la proteína de fusión no procesada. El transformante también producía la forma procesada de la proteína de fusión.

Cuando se expresa la xilanasa de actinomicetes sencilla en *T. reesei* como una fusión de un gen homólogo, pueden conseguirse elevados niveles de producción de la proteína heteróloga. Cuando se expresaba el gen *am35* de *Actinomadura* bajo el promotor de *cbh1* como una fusión con mananasa, el nivel de xilanasa producida era aproximadamente de 500-800 mg/l. Cuando se expresaba *xynA* de *T. fusca* en *T. reesei* uniéndola al mismo promotor (*cbh1*), sin fusión a un gen homólogo, se producían solamente 50-100 mg/l de xilanasa. La identidad entre las dos xilanasas de actinomicetes, xilanasa AM35 de *Actinomadura* y xilanasa A de *T. fusca* es del 76% a nivel de aminoácidos.

Ejemplo 17

Experimentos de Blanqueado Usando la Xilanasa de *Actinomadura flexuosa* Sintetizada en *Trichoderma reesei* como una Proteína de Fusión con Mananasa

Los experimentos de blanqueado se hicieron para determinar la utilidad de la actividad xilanasa AM35 de *A. flexuosa* sintetizada en *Trichoderma reesei* como una proteína de fusión con mananasa en blanqueado TCF (totalmente libre de cloro) de pulpa de papel kraft.

Los medios de cultivo de los transformantes ALKO3620/pALK945/8, ALKO3620/pALK948/27 y ALKO3620/pALK1022/29 (Ejemplo 16) se añadieron a pulpa de papel kraft de madera blanda deslignificada con oxígeno acabada (número kappa 16) en la cantidad de 100 nkat/g de materia seca de pulpa. La actividad xilanasa se midió a pH 7 y 70°C con 60 minutos de tiempo de incubación. Los tratamientos enzimáticos se hicieron a pH 7 y 80°C durante una hora. La pulpa de referencia se trató del mismo modo pero sin adición de enzimas. El blanqueado se realizó usando la secuencia QP. Primero se retiraron los metales por quelación con EDTA (fase quelante, Q) y las pulpas después se blanquearon con peróxido de hidrógeno (fase de peróxido, P). Los resultados se muestran en la Tabla 7.

TABLA 7

Tratamiento enzimático	Referencia	ALKO3620 pALK945/8	ALKO3620 PALK948/27	ALKO3620 pALK1022/29
Consistencia, %	3,5	3,5	3,5	3,5
Tiempo de retención, horas	1	1	1	1
Dosificación enzimática, nkat/g	0	100	100	100
Temperatura, °C, inicio/final	81/79	82/80	80/77	83/79
pH, inicio/final	7,1/6,9	6,9/6,9	7,0/7,0	7,0/7,3
Fase quelante, Q				
Consistencia, %	3,0	3,0	3,0	3,0
Tiempo de retención, horas	1	1	1	1
EDTA, % de	0,2	0,2	0,2	0,2

materia seca

	75	76	74	76
Temperatura al				
final, °C				
pH al final	5,2	5,1	5,0	4,9
Fase de peróxido,				
P				
Consistencia, %	10	10	10	10
Tiempo de	3	3	3	3
retención, horas				
Temperatura, °C	80	80	80	80
pH, inicio/final	11,3/10,8	11,4/10,8	11,4/10,8	11,4/10,9
Dosificación de	3,0	3,0	3,0	3,0
peróxido, %				
Peróxido	2,3	2,3	2,3	2,3
consumido, %				
Brillo, %	64,2	66,2	65,5	65,9
Viscosidad, ml/g	840	850	850	870

El uso de los medios de cultivo que contienen actividad xilanasa de *A. flexuosa* de los transformantes ALKO3620/pALK945/8, ALKO3620/pALK948/27 y ALKO3620/pALK1022/29 como pretratamiento de pulpa en blanqueado con peróxido a 80°C aumentó el brillo (2 unidades como mucho) de las pulpas obtenidas sin aumentar la cantidad de peróxido que se consumió. La viscosidad de las pulpas no se redujo a causa de la baja actividad celulasa contaminante en los medios de cultivo.

El experimento de blanqueado también se realizó a pH 7 y 70°C durante una hora usando los mismos medios de cultivo que antes. Los valores de brillo de las pulpas finales fueron similares (1,2 unidades como mucho) que cuando los pretratamientos enzimáticos se realizaron a pH 7 y 80°C.

Ejemplo de Referencia 18

Purificación y Caracterización de la Xilanasa de 35 kDa Recombinante de Actinomadura flexuosa

Se envió una muestra de 0,5 mg de xilanasa purificada de 35 kDa de *A. flexuosa* DSM43186 a Diabor Ltd (Kiviharjuntie 11 A 4, FIN-90220 Oulu, Finlandia) para producir anticuerpos policlonales en conejos. El título del anticuerpo producido fue bueno, y fue adecuada una dilución de 1:10.000 para transferencias de Western.

Los productos proteicos del gen de xilanasa de 35 kDa de *A. flexuosa* DSM43186 en *T. reesei* tanto en ALKO3620/pALK945/8 como en ALKO3620/pALK945/6 se identificaron procesando muestras del medio de cultivo obtenido de cultivos en fermentador en SDS-PAGE seguido de transferencia de Western con el anticuerpo contra la xilanasa de 35 kDa de tipo silvestre. La transferencia de Western se realizó con el sistema ProtoBlot Western blot AP (Promega, U.S.A) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron proteínas patrón Bio-Rad (patrones LMW) preteñidas como patrones de masa molecular.

Las diferentes bandas identificadas a partir de ALKO3620/pALK945/8 dependen de las condiciones de cultivo y el tiempo de crecimiento. Como conjunto, cinco bandas diferentes reaccionaron con el anticuerpo contra la xilanasa de 35 kDa (Figura 23A). Se estimó que la banda superior era una proteína de 80 kDa. Se estimó que las otras cuatro bandas eran de 27, 30, 31 y 34 kDa. Se estimó que la xilanasa de 35 kDa de *A. flexuosa* (tipo silvestre) que estaba en el gel era de 39 kDa. Por tanto, el gen de ALKO3620/pALK945/8 no producía una banda de xilanasa del mismo tamaño que la xilanasa de tipo silvestre. La masa de la banda superior, 80 kDa, se correlaciona bien con la proteína de fusión intacta. ALKO3620/pALK945/6 mostró de dos a tres bandas en las transferencias de western, también dependiendo de las condiciones de cultivo (Figura 23B). La banda superior se estimó a aproximadamente 80 kDa y por tanto

probablemente la proteína de fusión intacta. La banda principal en las transferencias de ALKO3620/pALK945/6 se estimó a 39 kDa y migraba paralela a la xilanasa de 35 kDa de tipo silvestre. Las muestras de medio de cultivo después de cultivo prolongado de la cepa ALKO3620/pALK945/6 mostraron también una débil banda de 31 kDa en transferencias de Western. La existencia de xilanasas de tamaño más pequeño después de cultivo prolongado del hongo sugiere que están presentes modificaciones post-traduccionales, por ejemplo proteólisis.

Las muestras de ALKO3620/pALK945/8 y ALKO3620/pALK945/6 anteriores se volvieron a procesar en SDS-PAGE y se transfirieron en membrana de PVDF. Las bandas obtenidas se cortaron de la transferencia en PVDF y se sometieron a degradación de Edman como se ha descrito en el Ejemplo 4. Todas las bandas mostraron la misma secuencia amino terminal, es decir, la SEC ID N° 5, que la xilanasa de 35 kDa de tipo silvestre (D-T-T-I-T-Q-). Por tanto, las modificaciones C-terminales deben suponer las diferencias observadas en las masas moleculares.

Para caracterizar adicionalmente los productos génicos de la xilanasa de 35 kDa recombinante de *A. flexuosa*, se purificaron las xilanasas de diferente masa molecular a partir de medios de cultivo adecuados de ALKO3620/pALK945/8 y ALKO3620/pALK945/6. La purificación se realizó esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 3. Muestras de 40 a 150 ml de medio de cultivo, dependiendo del contenido de xilanasa estimado, se ajustaron a pH 9,1 con NaOH 1 M. Las muestras se centrifugaron a 11.000 g (+4°C durante 20 min.). Los sobrenadantes se ajustaron a 3,7 mS/cm y se aplicaron por separado en una columna de 5 x 18 cm de DEAE-Sepharose FF (Pharmacia) equilibrada con Na₂HPO₄ 20 mM, pH 8,6, a un caudal de 30 ml/min. La mayoría de las proteínas de *T. reesei* se unieron al DEAE, pero la actividad xilanasa se encontró en el flujo.

El flujo de las fracciones que contenían actividad xilanasa se combinó y se añadió NaCl a 2 M. La combinación se aplicó en una columna de 5 x 13 cm de Fenil-Sepharose FF (Pharmacia) equilibrada a un caudal de 20 ml/min con Na₂HPO₄ 40 mM, pH 8,6, que contenía NaCl 2 M. La elución se realizó a un caudal de 20 ml/min con un gradiente de tampón de equilibrado al 100% a Na₂HPO₄ 40 mM al 100%, pH 8,6, en 20 min. La columna se lavó adicionalmente con este tampón durante 10 min. La elución se continuó durante 30 min. con un gradiente de Na₂HPO₄ 40 mM al 100%, pH 8,6, a Na₂HPO₄ 40 mM al 100%, pH 8,6, que contenía etilenglicol al 60%. Se recogieron fracciones de 10 ml y se ensayaron para la actividad xilanasa, en SDS-PAGE así como en transferencias de Western. Las fracciones que contenían xilanasas purificadas se combinaron y almacenaron a -20°C. La xilanasa de 35 kDa de tipo silvestre se purificó como anteriormente a partir de una muestra de medio de cultivo de 840 ml de *A. flexuosa* (DSM43186).

Las xilanasas recombinantes de *A. flexuosa* purificadas y la xilanasa de 35 kDa de tipo silvestre se procesaron en SDS-PAGE (Figura. 24). A partir de ALKO3620/pALK945/6 se obtuvo una xilanasa de 39 kDa purificada y a partir de ALKO3620/pALK945/8 una xilanasa de 30 kDa y una 27 kDa. Éstas, así como la xilanasa de 35 kDa de tipo silvestre, se sometieron a análisis espectrométrico de masas en un espectrómetro de masas Brucker Biflex Reflector MALDI-TODF (Brucker-Franzen GmbH, Alemania). La xilanasa de 35 kDa de tipo silvestre mostró una masa de 32.857, que está de acuerdo con la masa calculada a partir del gen de 35 kDa de *A. flexuosa* (32.876), Ejemplo 11. Por tanto, la xilanasa de 35 kDa de tipo silvestre parece estar no glicosilada. La xilanasa de 39 kDa de ALKO3620/pALK945/6 dio una masa de 33.429 por espectrometría de masas. Como el extremo N-terminal de esta muestra era idéntico a la xilanasa de tipo silvestre, probablemente una extensión o glicosilación C-terminal justifique la diferencia de 572 Da en la masa. No hay codones de stop en la secuencia génica, después del codón de stop de tipo silvestre, que podría explicar la mayor masa de la xilanasa recombinante. Por tanto, probablemente se ha glicosilado uno o más de los cinco sitios potenciales de N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr, X=Pro) en *T. reesei*. Las dos xilanasas de 30 y 27 kDa purificadas a partir de ALKO3620/pALK945/8 tenían la misma secuencia N-terminal que la xilanasa de 35 kDa de tipo silvestre. En el espectrómetro de masas sus masas se determinaron a 23.974 y 21.974 respectivamente. Las masas moleculares estimadas a partir de SDS-PAGE por tanto eran mayores que las masas determinadas por espectrometría de masas. La xilanasa de 39 kDa de SDS-PAGE se volvió a designar a 33,4 kDa y la xilanasa de 30 kDa a 23,8 kDa y la xilanasa de 27 kDa a 22 kDa. La designación de la xilanasa de *A. flexuosa* de tipo silvestre se mantuvo como xilanasa de 35 kDa.

La concentración proteica de las xilanasas purificadas se determinó a A₂₀₅ por el procedimiento de Scopes (Scopes, Anal, biochem. 59: 277-287, 1974). Los valores K_m y los valores k_{cat} (basados en la concentración proteica y la masa molecular) de las xilanasas purificadas se determinaron a pH 7 y 70°C en el intervalo de sustrato de 2 a 25 mg/ml (xilano de abedul, Roth 7 500). Los valores k_{cat} obtenidos fueron ligeramente más pequeños tanto para la xilanasa de 35 como la de 33,4 kDa en comparación con las xilanasas de 22 y 23,8 kDa (Tabla 8). Sin embargo, los valores K_m para las xilanasas de 22 y 23,8 kDa (aproximadamente 10 mg/ml) fueron 2,5 veces mayores que los valores K_m correspondientes de las xilanasas de 33,4 y 35 kDa (aproximadamente 4 mg/ml). Como se considera a partir de la secuencia proteica del gen de 35 kDa, los productos de xilanasa de 22 y 23,8 kDa pierden el dominio de unión a xilano C-terminal (véase el Ejemplo 11) que provoca una unión menos eficaz a xilano. La forma de 22 kDa aproximadamente estimada contiene solamente un dominio central sin la región engarzadora. La forma de 23,8 kDa contiene, además, parte de la región engarzadora.

La determinación del pI de las xilanasas purificadas se realizó procesando las muestras en una columna de cromatografía de intercambio de 0,5 x 20 cm de mono P (Pharmacia) equilibrada con Tris-HCl 0,075 mM pH 9,3. La elución se realizó con politampón (10 ml de politampón en 100 ml de agua y ajustado a pH 6 con ácido acético 1 M) a un caudal de 0,5 ml/min y se recogieron fracciones de 0,5 ml. Se determinaron el pH y la actividad xilanasa de las fracciones, y la actividad xilanasa se encontró en la fracción correspondiente a su pI (Tabla 8).

TABLA 8

Cepa de xilanasa (kDa)	masa (kDa)	Km (mg/ml)	kcat (1/s)	pl
33,4 ALKO3620/pALK945/6	33,429	3,8	1397	8,6
23,8 ALKO3620/pALK945/8	23,769	9,8	1525	7,6
22 ALKO3620/pALK945/8	21,974	10,0	1682	8,2
35 DSM43186	32,857	4,5	1135	8,5

La dependencia de la temperatura y el pH de las xilanasas purificadas se determinaron incubando las muestras durante 60 min. con sustrato en el intervalo de pH de 5,1 a 7,9 y a temperaturas de 60, 70 y 80°C, esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 5. A partir de estos resultados, parece que las xilanasas de longitud completa, de 35 y 33,4 kDa, son ligeramente más activas a temperaturas y pH mayores que las xilanasas más cortas, de 22 y 23,8 kDa (Figura 25).

Las xilanasas purificadas se ensayaron para la estabilidad térmica incubando las muestras a 80°C y tanto a pH 5 como a pH 7 (en tampón de McIlvain 50 mM). Las muestras se extrajeron a intervalos de tiempo adecuados, y la actividad residual se midió a pH 7 y 70°C (5 min. de tiempo de incubación). Las semi-vidas de las xilanasas se muestran en la Tabla 9. Las dos xilanasas, de 22 y 23,8 kDa, mostraron una semi-vida más larga que las xilanasas de longitud completa de 33,4 y de 35 kDa en las condiciones ensayadas. Esta diferencia de estabilidad podría ser un resultado de la presencia del dominio de unión separado en las xilanasas de longitud completa, que desestabiliza la estructura a elevadas temperaturas en ausencia de sustrato. En los experimentos de dependencia de la temperatura (de dan resultados ligeramente diferentes), la presencia de sustrato que se une al dominio de unión a xilano puede, por el contrario, estabilizar las xilanasas de longitud completa.

TABLA 9

Xilanasa (kDa)	t _{1/2} (min) (80°C, pH 5)	t _{1/2} (min) (8°C, pH 7)
33,4	13	17
23,8	157	95
22	123	63
35	32	31

Aparentemente los truncamientos de la xilanasa de 35 kDa desde el extremo C-terminal tienen algunos, aunque no graves, efectos en las características cinéticas de esta xilanasa. Un fragmento de 22 kDa de la xilanasa de 35 kDa aún es activo y muestra cinética similar que sus equivalentes más largos.

Ejemplo de Referencia 19

Experimentos de Blanqueado Usando las Formas Purificadas de 22,0 kDa, 23,8 kDa y 33,4 kDa de la Xilanasa AM35 de Actinomadura flexuosa

El efecto de refuerzo blanqueante de las formas purificadas de 22,0 kDa, 23,8 kDa y 33,4 kDa de la xilanasa AM35 (Ejemplo 18) se ensayó en blanqueado con peróxido de una fase.

Las formas purificadas se añadieron a pulpa de papel kraft de madera blanda deslignificada con oxígeno acabada en la cantidad de 100 nkat/materia seca de pulpa como tal sin un agente protector (resultados en la Tabla 10) y con medio de cultivo de *T. reesei* adecuado para el fondo protector (resultados en la Tabla 11). La actividad xilanasa de las formas purificadas así como el medio de cultivo de *T. reesei* se midieron a pH 7, 70°C con 5 minutos de tiempo de incubación. Los tratamientos enzimáticos se hicieron a pH 8, 80°C durante una hora. Las pulpas de referencia se trataron del mismo modo sin adición de enzimas. Los blanqueados se realizaron usando la secuencia QP. Primero se retiraron los iones metálicos añadiendo EDTA al 0,2% de materia seca de pulpa (fase quelante, Q). Las pulpas después se blanquearon con peróxido de hidrógeno (P) usando los siguientes compuestos químicos: H₂O₂ al 3%, NaOH al 3%, DTPA al 0,2% y MgSO₄ al 0,5%. Las condiciones de las fases Q y P se muestran en las Tablas 10 y 11.

TABLA 10

Tratamiento enzimático	Referencia	22,0 kDa	23,8 kDa	33,4 kDa
Consistencia, %	3,5	3,5	3,5	3,5
Tiempo de retención, horas	1	1	1	1
Dosificación enzimática, nkat/g	0	100	100	100
Temperatura, °C, inicio/final	80/79	80/79	79/79	81/80
pH, inicio/final	8,3/8,2	8,1/8,0	8,2/8,1	8,2/8,1
Fase quelante, Q				
Consistencia, %	3,0	3,0	3,0	3,0
Tiempo de retención, horas	1	1	1	1
EDTA, % de materia seca	0,2	0,2	0,2	0,2
Temperatura al final, °C	73	73	72	74
pH al final	5,8	5,6	5,7	5,8
Fase de peróxido, P				
Consistencia, %	10	10	10	10
Tiempo de retención, horas	3	3	3	3
Temperatura, °C	80	80	80	80
pH, inicio/final	11,3/10,9	11,31/10,8	11,3/10,7	11,3/10,7
Dosificación de peróxido, %	3,0	3,0	3,0	3,0
Peróxido consumido, %	2,3	2,3	2,3	2,3
Brillo, %	64,7	65,0	65,6	65,5

Las formas de 33,4 kDa y 23,8 kDa de la xilanasa AM35 parecieron reforzar el efecto blanqueante en blanqueado con peróxido cuando el pH era 8, la temperatura 80°C, el tiempo una hora y la dosificación enzimática 100 nkat/g de pulpa seca. La forma de 22,0 kDa no potenció la capacidad de blanqueado probablemente a causa de la pérdida del dominio de unión a sustrato y la región engarzadora incompleta. Generalmente el aumento de brillo fue bastante pequeño, 0,9 unidades como mucho. Esto puede deberse al hecho de que las enzimas purificadas se añadieron como tales a 80°C sin que la pulpa tuviera ningún agente protector o proteína vehículo, tal como medio de cultivo de *T. reesei* o BSA.

El segundo experimento de blanqueado se realizó del mismo modo que el primero. Solamente las formas enzimáticas purificadas se mezclaron primero con un medio de cultivo de *T. reesei* y después se añadieron a las pulpas. Este medio de cultivo fue similar al medio de cultivo del que se purificaron las formas enzimáticas. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

El resultado del segundo experimento de blanqueado fue similar al primero. Los tratamientos con las formas de 33,4 kDa y 23,8 kDa aumentaron el brillo aproximadamente 1,5 unidades en comparación con el tratamiento en el que solamente se usó medio de cultivo de *T. reesei*. También la forma de 22 kDa dio un aumento de aproximadamente 1 unidad de brillo. Los resultados muestran que el medio de cultivo de *T. reesei* funcionaba como un fondo protector y las formas proteicas de 33,4 kDa y 23,8 kDa, cuyas regiones engarzadoras entre los dominios catalítico y de unión están intactos, aumentaron los valores de brillo más que la forma de 22 kDa.

TABLA 11

	Referen	22,0	23,8	33,4	Medio de cultivo de <i>T. reesei</i> usado como fondo de protección
	cia	kDa	kDa	kDa	
Tratamiento enzimático					
Consistencia, %	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Tiempo de retención, horas	1	1	1	1	1
Dosificación enzimática, nkat/g	0	100 (+100*)	100 (+100*)	100 (+100*)	100*
Temperatura, °C. inicio/final	81/80	80/80	80/80	82/82	81/80
pH inicio/final	7,9/7,8	7,6/7,7	7,6/7,7	7,6/7,6	7,6/7,6
Fase quelante, Q					
Consistencia, %	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Tiempo de retención, horas	1	1	1	1	1
EDTA, % de materia seca	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Temperatura al final, °C	76	75	75	76	77
pH al final	5,2	5,2	5,2	5,2	5,1
Fase de peróxido, P					
Consistencia, %	10	10	10	10	10
Tiempo de retención, horas	3	3	3	3	3
Temperatura, °C	80	80	80	80	80
pH, inicio/final	11,4/ 10,7	11,4/ 10,7	11,5/ 10,8	11,5/ 10,8	11,6/ 10,8
Dosificación de peróxido, %	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Peróxido consumido, %	2,2	2,3	2,3	2,3	2,3
Brillo, %	62,1	64,1	64,6	64,5	63,0
*) La actividad xilanasa se origina en el medio de cultivo de <i>T. reesei</i> que consta de las propias xilanasas de <i>T. reesei</i> .					

Ejemplo de Referencia 20

Producción de la forma de 23,8 kDa de la xilanasa de 35 kDa de Actinomadura flexuosa en Trichoderma reesei

5 Se construyen cepas de *T. reesei* para la producción de fragmentos xilanolíticamente activos pero acortados, aún catalíticamente activos de las enzimas de actinomicetes de longitud completa. Especialmente, se construyen cepas de *T. reesei* para la producción de la forma de 23,8 kDa (véase el ejemplo 18) de la xilanasa de 35 kDa de *A. flexuosa*. La expresión de la forma acortada puede conducir a actividad xilanasa potenciada en el medio de cultivo.

10 Se prepara un vector recombinante que codifica una xilanasa o un dominio deseado de la misma fusionando la secuencia que codifica la xilanasa o un dominio deseado de la misma con la secuencia de una proteína fúngica secretable o uno o más dominios funcionales de dicha proteína. Especialmente, la secuencia que codifica la forma de 23,8 kDa de la xilanasa de 35 kDa de *A. flexuosa* se fusiona a la celulasa o hemicelulasa de *T. reesei* como se describe en el documento US 5.298.405, el documento WO 93/24621 y Stalbrand y col., Appl. Environ. Microbiol. 61: 1090-1097 (1995). Especialmente, la enzima se selecciona entre el grupo constituido por CBHI, CBHII, EGI, EGII, XYLI, XYLII y MANI, o un dominio funcional de las mismas.

15 Pueden construirse proteínas de fusión que contengan un dominio central N-terminal de mananasa, xilanasa, celobiohidrolasa o endoglucanasa o los dominios central y de bisagra de las mismas, fusionado a la secuencia de xilanasa de *A. flexuosa* que codifica la forma de 23,8 kDa. El resultado es una proteína que contiene regiones centrales o centrales y de bisagra N-terminales de mananasa, xilanasa, celobiohidrolasa o endoglucanasa y una forma C-terminal de 23,8 kDa de *A. flexuosa*. La proteína de fusión contiene las actividades mananasa, xilanasa, celobiohidrolasa o endoglucanasa y xilanasa de diversos dominios proporcionados en la construcción de fusión.

25 También pueden construirse proteínas de fusión de tal modo que se incluya la cola de mananasa o celobiohidrolasa o endoglucanasa o un fragmento deseado de las mismas, colocado antes de la secuencia de xilanasa de *A. flexuosa*, especialmente para permitir el uso de un sitio de proteasa no específico en la cola como un sitio de proteasa para la recuperación de la secuencia de celulasa a partir de la proteína de fusión expresada. Como alternativa, pueden construirse proteínas de fusión que proporcionen un sitio de proteasa en un engarce que está colocado antes de la celulasa xilanasa de *A. flexuosa*, con o sin secuencias de cola.

Ejemplo de Referencia 21

Producción de Celulasas de Thermomonospora fusca en Trichoderma reesei

35 *T. fusca* produce al menos seis enzimas degradantes celulasa, cuatro endoglucanasas E1, E2, E4 y E5 y dos exocelulasas E3 y E6 (Irwin y col., Biotechnol. and Bioeng. 42:1002-1013 (1993)). Se construyen cepas de *T. reesei* para la producción eficaz de celulasas de *T. fusca*. Especialmente, se construyen cepas de *T. reesei* que expresan la endocelulasa de *T. fusca*, E5. La clonación del gen de E5 se describe en Lao y col., J. Bacteriol. 173: 3397-3407 (1991).

45 Se prepara un vector recombinante que codifica una celulasa fusionando la secuencia que codifica un polipéptido con actividad celulolítica con la secuencia de una proteína fúngica secretable o al menos un dominio funcional de dicha proteína. Especialmente la secuencia que codifica la celulasa de *T. fusca* se fusiona a la celulasa o hemicelulasa de *T. reesei* o uno o más dominios funcionales de dicha celulasa o hemicelulasa, como se describe en el documento US 5.298.405, el documento WO 93/24621 y Stalbrand y col., Appl. Environ. Microbiol. 61:1090-1097 (1995). Especialmente, la enzima se selecciona entre el grupo constituido por CBHI, CBHII, EGI, EGII, XYLI, XYLII y MANI, o un dominio de las mismas, tal como la señal de secreción o la secuencia central.

50 Pueden construirse proteínas de fusión que contengan un dominio central N-terminal de mananasa, xilanasa, celobiohidrolasa o endoglucanasa o dominios central y de bisagra de las mismas, fusionados a la secuencia de celulasa de *T. fusca*. El resultado es una proteína que contiene regiones centrales o centrales y de bisagra N-terminales de mananasa, xilanasa, celobiohidrolasa o endoglucanasa y una celulasa C-terminal de *T. fusca*. La proteína de fusión contiene actividades mananasa, xilanasa, celobiohidrolasa o endoglucanasa y celulasa de diversos dominios proporcionados en la construcción de fusión.

55 También pueden construirse proteínas de fusión de modo que se incluya la cola mananasa o celobiohidrolasa o endoglucanasa o un fragmento deseado de las mismas, colocada antes de la secuencia de celulasa de *T. fusca*, especialmente para permitir el uso de un sitio de proteasa no específico en la cola como sitio de proteasa para la recuperación de la secuencia de celulasa a partir de la proteína de fusión expresada. Como alternativa, pueden construirse proteínas de fusión que proporcionen un sitio de proteasa en un engarce que se coloca antes de la celulasa de *T. fusca*, con o sin secuencias de cola.

65

Ejemplo de Referencia 22

Proteína Bacteriana Expresada en Aspergillus

5 Se prepara un vector recombinante que codifica una enzima bacteriana fusionando la secuencia que codifica la enzima a una proteína secretable de *Aspergillus*. La proteína es preferiblemente glucoamilasa o α -amilasa de *A. niger* o *A. niger* var. *awamori*; o uno o más dominios funcionales de las mismas. (Stoffer y col., Biochem. J. 292:197-202 (1993); Svensson y col., Structure-Function relationship in amilases, Ed. R.B. Friedman. Biotechnology of Amylo-dextrin Oligosaccharides. ACS Symposium Serium 458:28-43 (1991); Boel y col., EMBO J. 3:1581-1585(1984), Boel
10 y col., EMBO J. 3:1097-1102 (1984), Korman y col., Curr. Genet 17: 203-212, (1990).)

Pueden construirse proteínas de fusión que contengan una glucoamilasa o α -amilasa N-terminal o uno o más dominios funcionales de las mismas, fusionada a una secuencia que codifique una proteína bacteriana tal como xilanasas de *Actinomadura*. El resultado es una proteína que contiene glucoamilasa o α -amilasa N-terminal o parte de las
15 mismas, y una xilanasas C-terminal de *Actinomadura*. La proteína de fusión contiene las actividades mananasa o glucoamilasa o α -amilasa y xilanasas de los diversos dominios proporcionados en la construcción de fusión.

También pueden construirse proteínas de fusión de modo que, por ejemplo, se incluya una cola glucoamilasa o un fragmento deseado de la misma, colocada antes de la secuencia de xilanasas de *Actinomadura*, especialmente para
20 permitir el uso de un sitio de proteasa no específico en la cola como sitio de proteasa para la recuperación de la secuencia de xilanasas a partir de la proteína de fusión expresada. Como alternativa, pueden construirse proteínas de fusión que proporcionen un sitio de proteasa en un engarce que se coloca antes de la xilanasas de *Actinomadura*, con o sin secuencias de cola.

25 El vector de expresión usa, por ejemplo, el promotor de glucoamilasa de *A. niger*. (Boel y col., EMBO J. 3:1581-1585 (1984)). El huésped de transformación puede ser alguna cepa de *Aspergillus niger* (Kelly y Hynes, EMBO J. 4:475-479 (1985)) o, por ejemplo, alguna cepa de *Aspergillus niger* var. *awamori* (por ejemplo, ATCC 38854). La cepa de *Aspergillus* elegida se transforma de forma similar a la descrita por Kelly y Hynes, EMBO J. 4:475-479 (1985)).

30 Los transformantes que producen la xilanasas de *Actinomadura* después se caracterizan de forma similar al Ejemplo 16 con modificaciones obvias para los especialistas en la técnica. El medio de cultivo usado puede ser medio completo de *Aspergillus*. (Rowlands y col., Mol. Gen. Genet. 126: 201-216 (1973).)

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un vector de expresión recombinante para la producción de proteínas bacterianas secretadas en el medio de cultivo de un huésped fúngico filamentoso que comprende un promotor unido de forma funcional a una secuencia de ADN, que codifica una secuencia señal y un dominio funcional de una proteína secretable de hongo filamentoso, siendo dicho dominio funcional un dominio de cola o un dominio central y de bisagra, en el que el dominio central contiene un sitio activo, el dominio de bisagra una región rica en serina-treonina y la cola un sitio de unión a sustrato, y que está fusionado en fase con una secuencia de ADN que codifica dicha proteína bacteriana, **caracterizado** porque el dominio funcional es un dominio de cola de una celulasa, o un dominio central y de bisagra de una mananasa, en el que la celulasa o mananasa son homólogas al huésped *Trichoderma*, y la proteína bacteriana es una xilanasas de actinomicetes.

2. El vector de expresión recombinante de la reivindicación 1, **caracterizado** porque el huésped es *Trichoderma reesei*.

3. El vector de expresión recombinante de la reivindicación 1, **caracterizado** porque la celulasa es una celobiohidrolasa o una endoglucanasa.

4. El vector de expresión recombinante de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, **caracterizado** porque la celulasa es CBHI.

5. El vector de expresión recombinante de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, **caracterizado** porque la celulasa es CBHII.

6. El vector de expresión recombinante de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, **caracterizado** porque la celulasa es EGI.

7. El vector de expresión recombinante de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, **caracterizado** porque la celulasa es EGII.

8. El vector de expresión recombinante de la reivindicación 1, **caracterizado** porque la mananasa es MANI.

9. El vector de expresión recombinante de la reivindicación 1, **caracterizado** porque el promotor es un promotor de hongo filamentoso.

10. El vector de expresión recombinante de la reivindicación 1, **caracterizado** porque el promotor es un promotor de *cbh1* de *Trichoderma reesei*.

11. El vector de expresión recombinante de la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho vector de expresión comprende las construcciones plasmídicas de la Figura 17, en el que el plásmido pALK1022 lleva la SEC ID N° 17, el plásmido pALK945 lleva la SEC ID N° 11, el plásmido pALK948 lleva la SEC ID N° 13, y el plásmido pALK1021 lleva la SEC ID N° 15, o un equivalente de los mismos, que codifican las secuencias de aminoácidos SEC ID N° 12, SEC ID N° 14, SEC ID N° 16, y SEC ID N° 18, respectivamente.

12. El vector de expresión recombinante de la reivindicación 1, **caracterizado** porque la secuencia de ADN que codifica una xilanasas de actinomicetes comprende la secuencia de ADN SEC ID N° 1 que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 o una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 85% a nivel de aminoácidos con la SEC ID N° 2 y actividad xilanólítica, o la secuencia de ADN SEC ID N° 3 que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4 o una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 85% a nivel de aminoácidos con la SEC ID N° 4 y actividad xilanólítica.

13. El vector de expresión recombinante de la reivindicación 1, **caracterizado** porque la secuencia de ADN que codifica una xilanasas de actinomicetes está comprendida en un plásmido seleccionado entre el grupo constituido por pALK923 (DSM9322), pALK938 (DSM9899), pALK939 (DSM9900), pALK940 (DSM9901), pALK941 (DSM9902) y pALK1056 (DSM9903) que codifica la xilanasas AM35 de *Actinomadure flexuosa*, o en un plásmido seleccionado entre un grupo constituido por el plásmido pALK927 (DSM9447) o el plásmido pALK928 (DSM9448) que codifica la xilanasas AM50 de *Actinomadure flexuosa*.

14. Un huésped fúngico filamentoso, **caracterizado** porque está transformado con al menos uno de los vectores de expresión de las reivindicaciones 1-13.

15. El uso del vector de expresión recombinante de las reivindicaciones 1-13 para la producción de una preparación que comprende una xilanasas de actinomicetes, que se secreta en un medio de cultivo durante el cultivo del huésped fúngico filamentoso.

ES 2 301 174 T3

16. El uso de acuerdo con la reivindicación 15, **caracterizado** porque la preparación es un medio de cultivo usado esencialmente libre de células huésped.

5 17. El uso de la preparación producida en las reivindicaciones 15 ó 16 para el blanqueado asistido con enzimas en una temperatura de procesamiento de 50-90°C, o 70-80°C.

18. El uso de la preparación producida en las reivindicaciones 15 ó 16 para el tratamiento enzimático de biomasa vegetal, o pulpa en la fabricación del papel.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

pH-opt: DSM43186

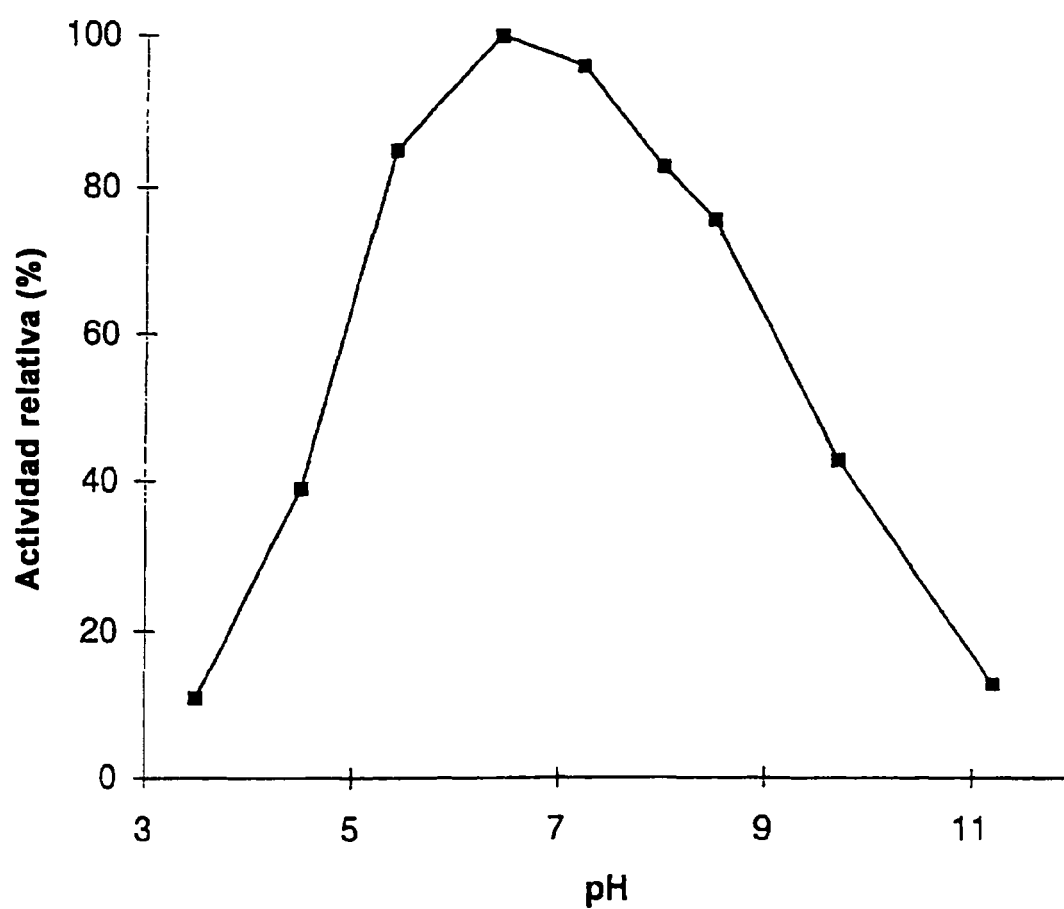


FIGURA 1

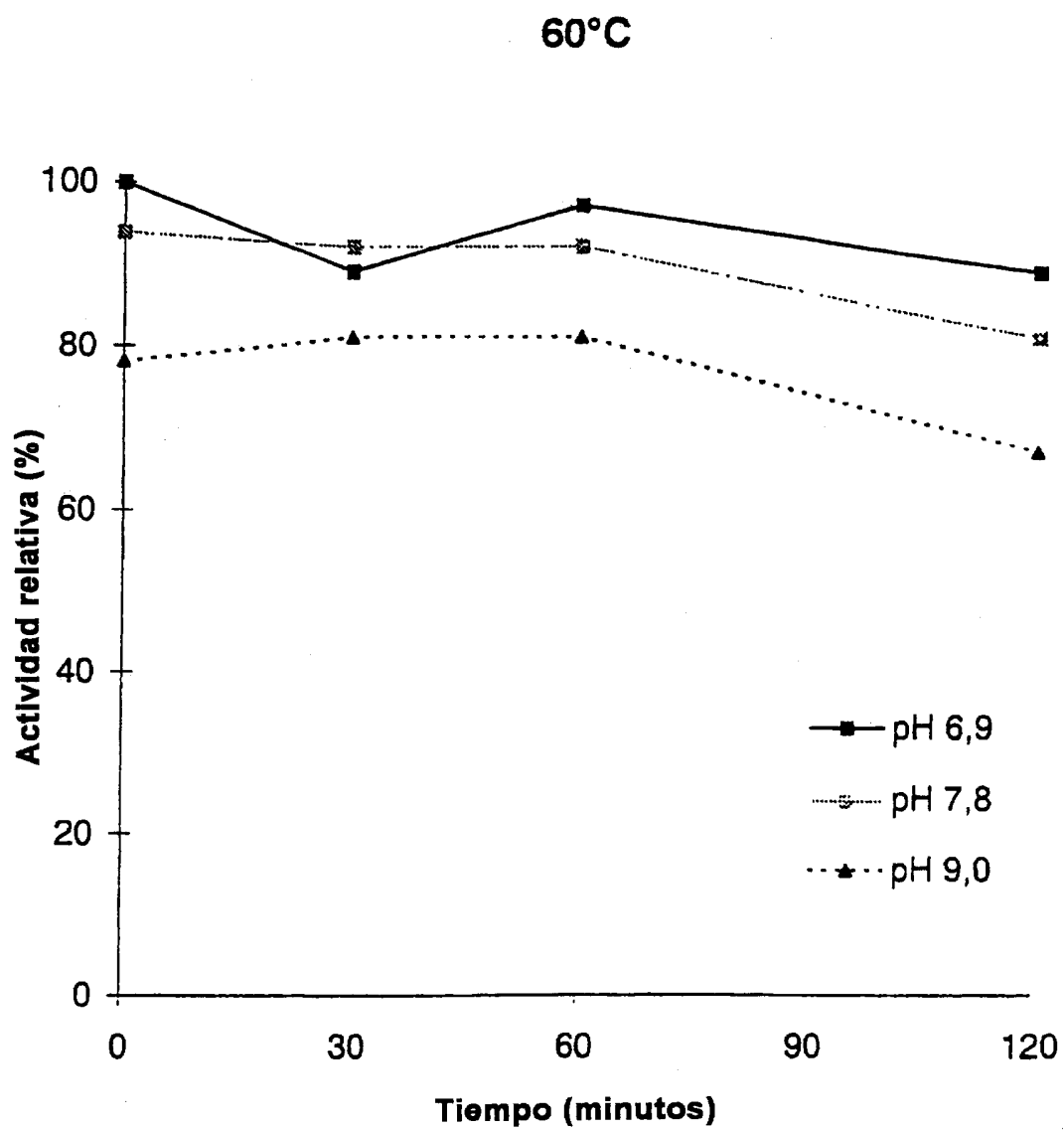


FIGURA 2A

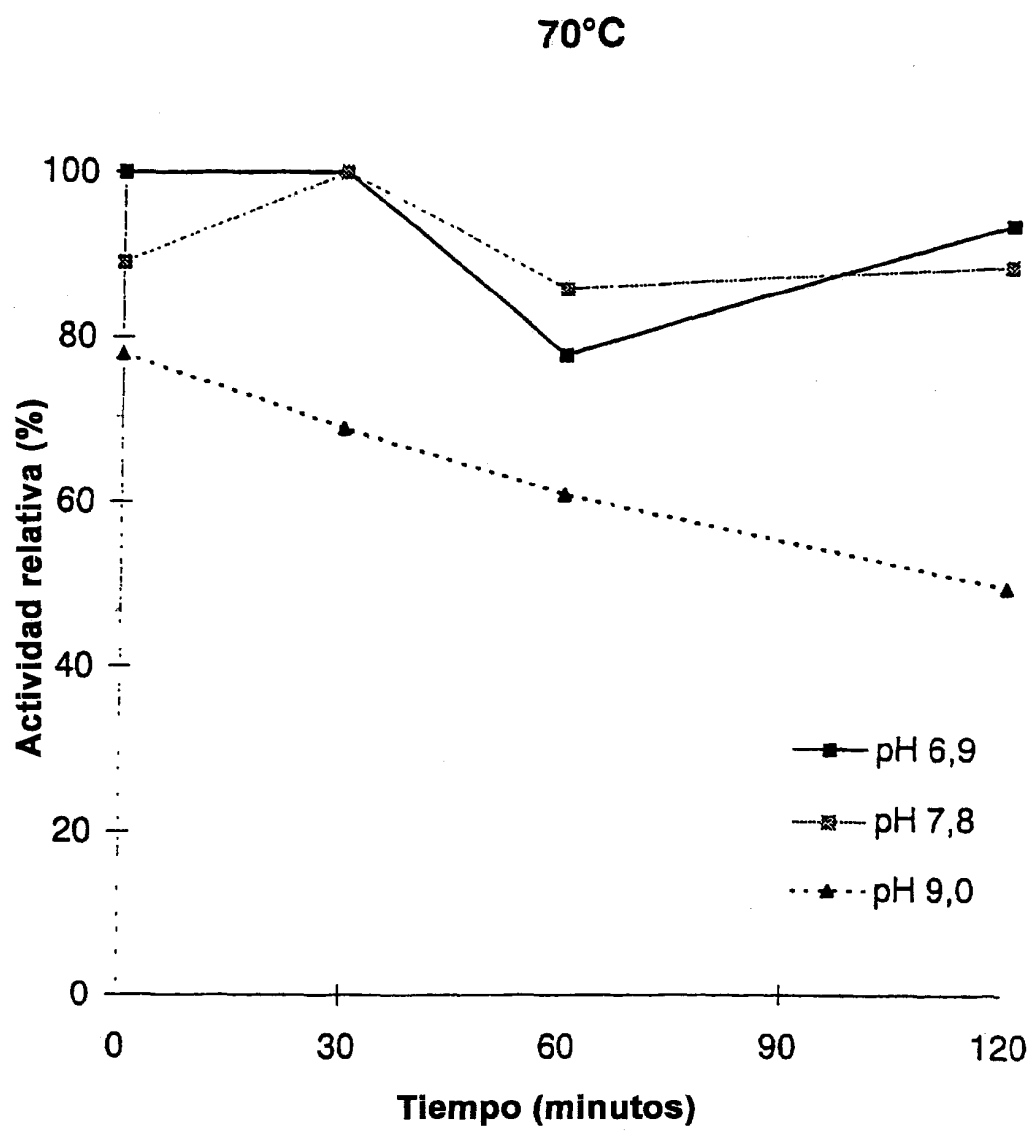


FIGURA 2B

80°C

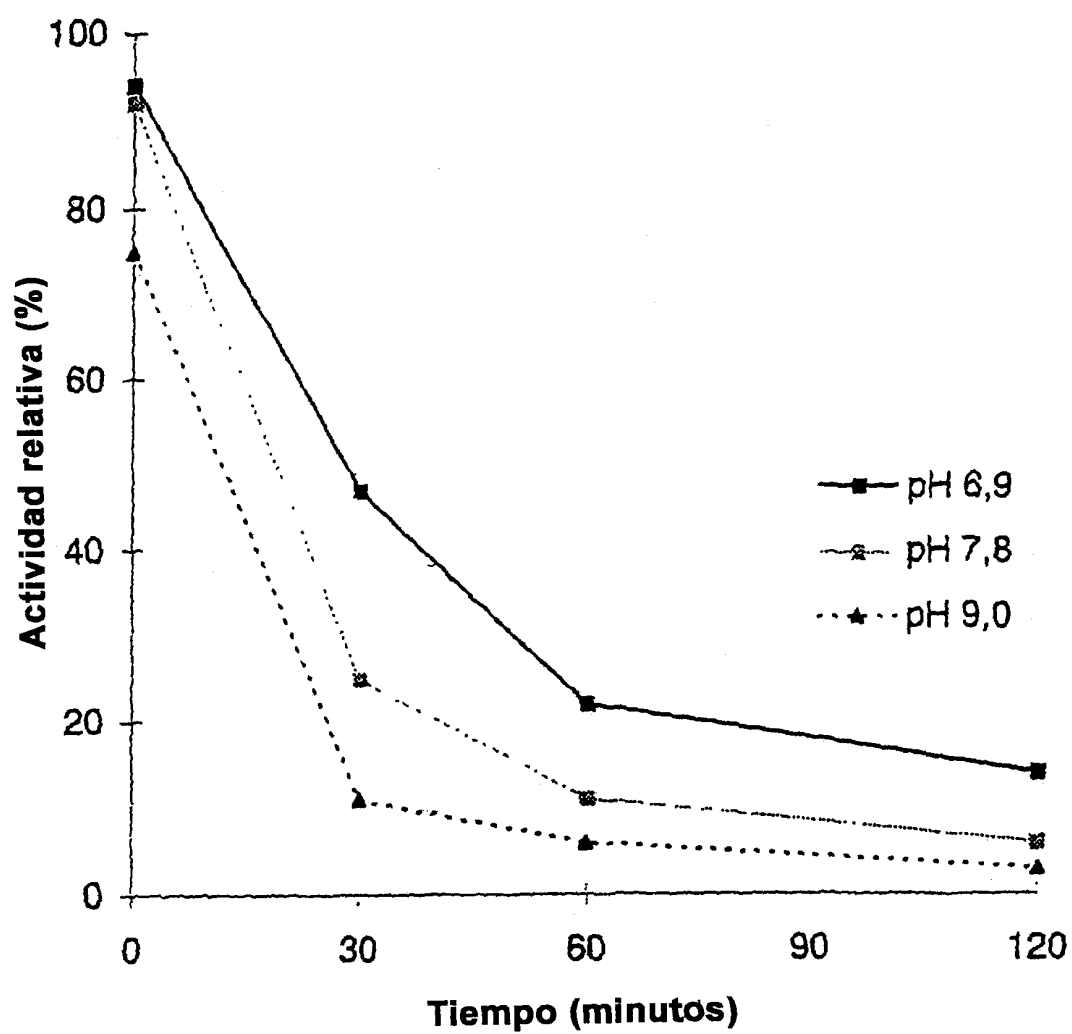


FIGURA 2C

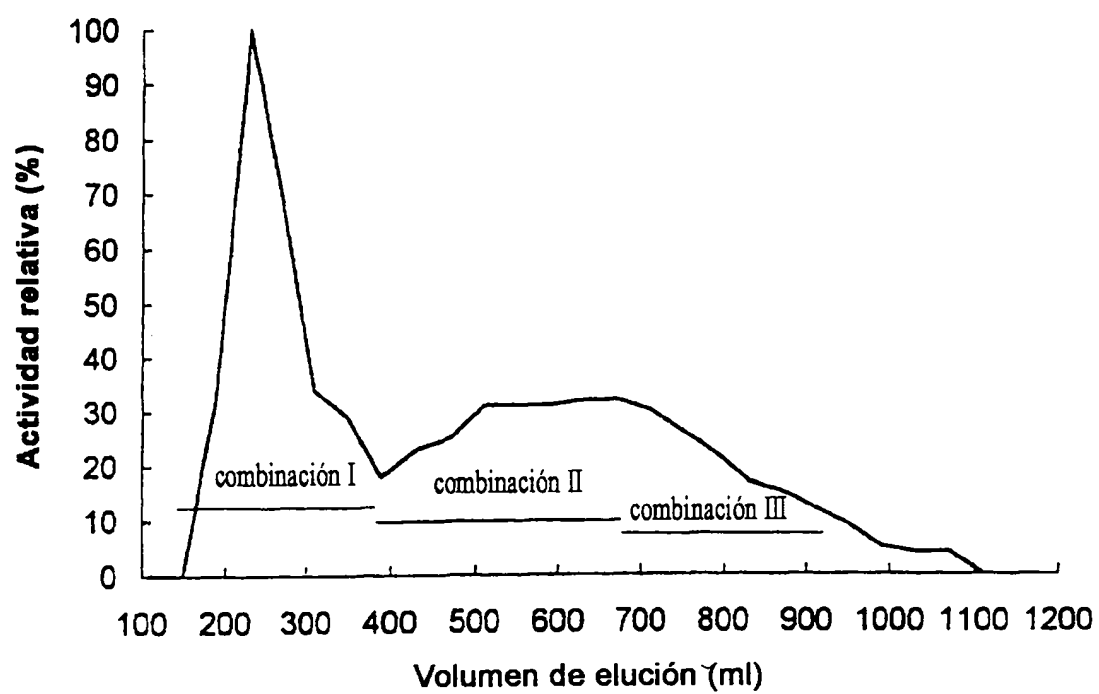


FIGURA 3

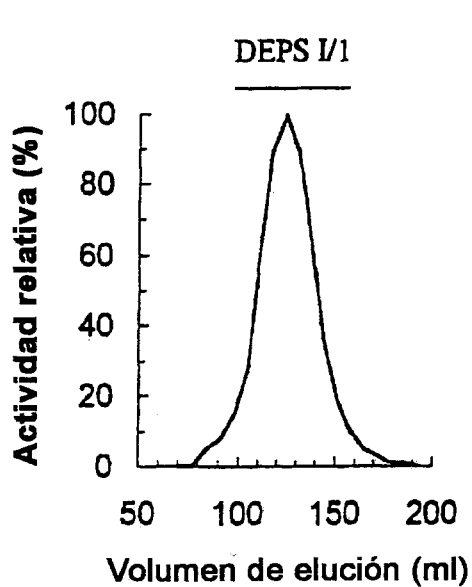


FIGURA 4A

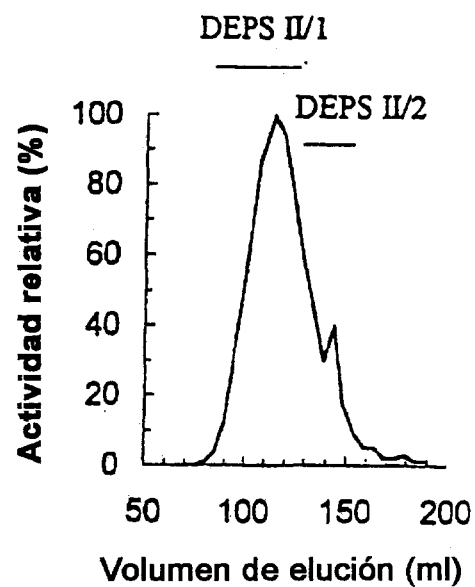


FIGURA 4B

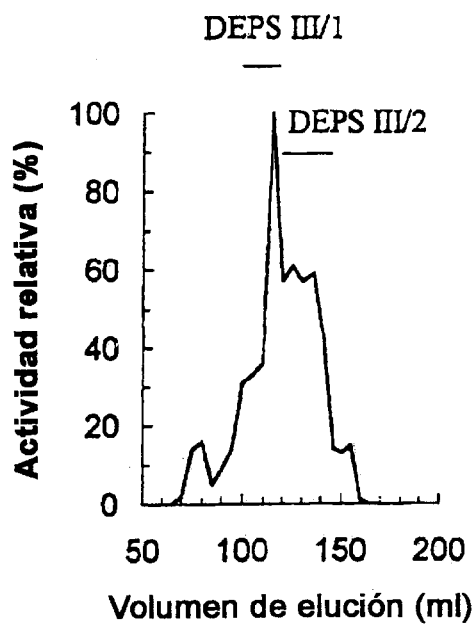


FIGURA 4C

CARRIL

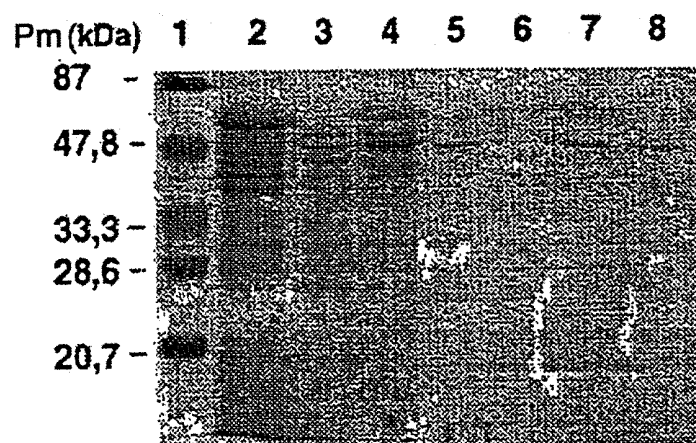


FIGURA 5A

CARRIL

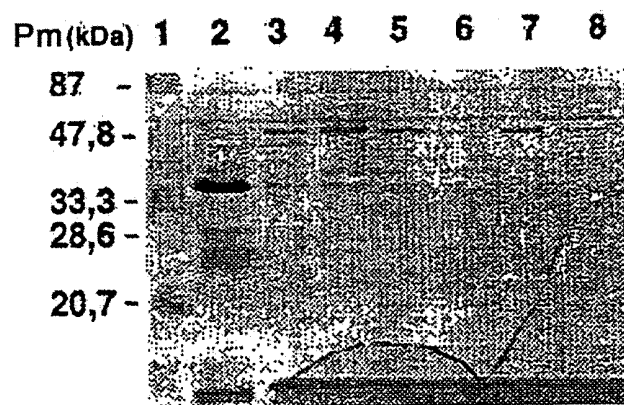


FIGURA 5B

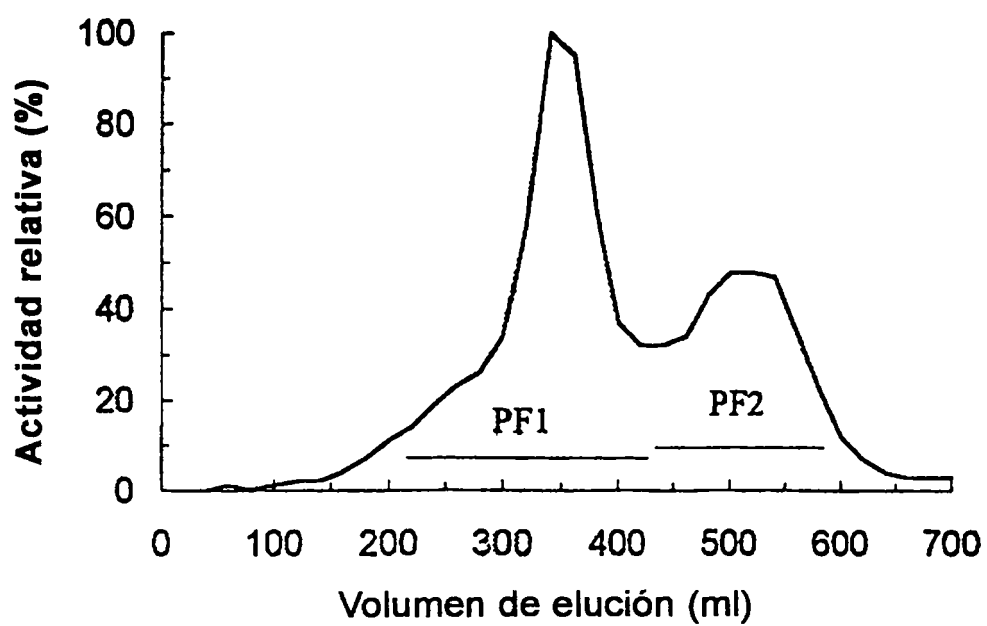


FIGURA 6A

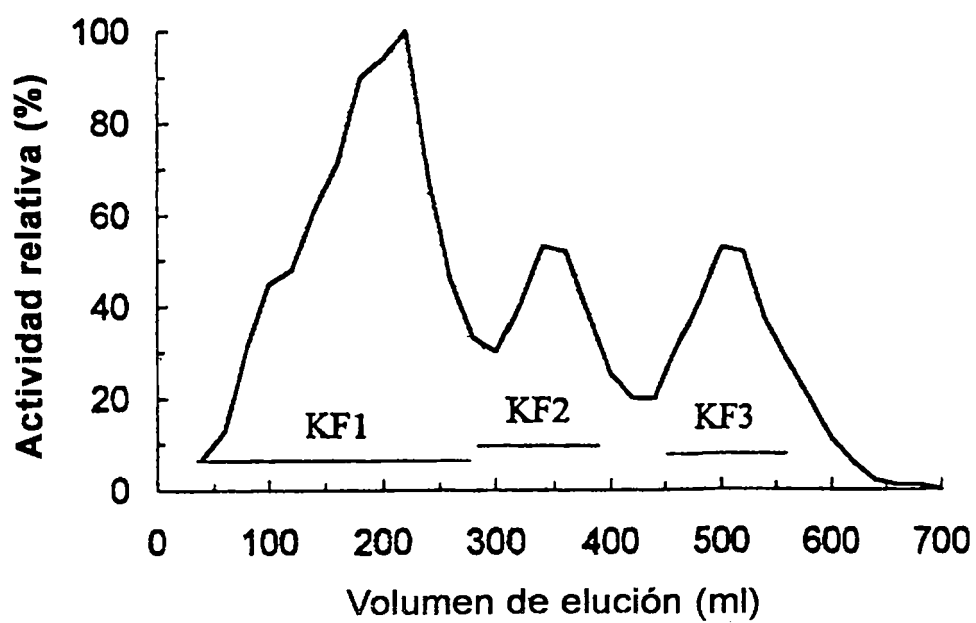


FIGURA 6B

CARRIL

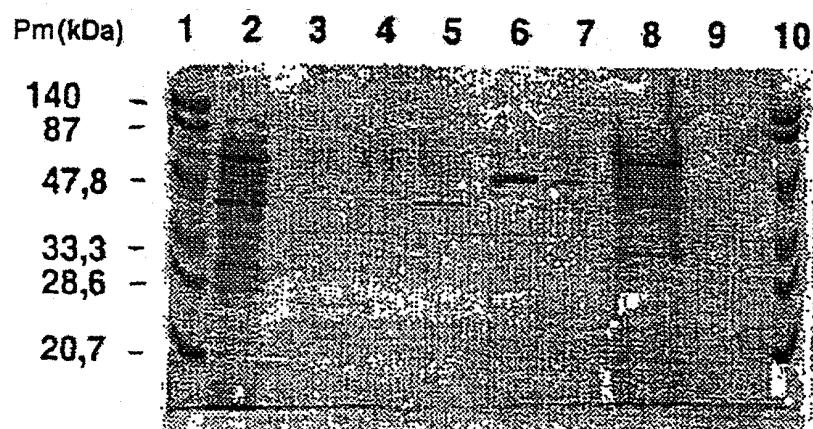


FIGURA 7A

CARRIL

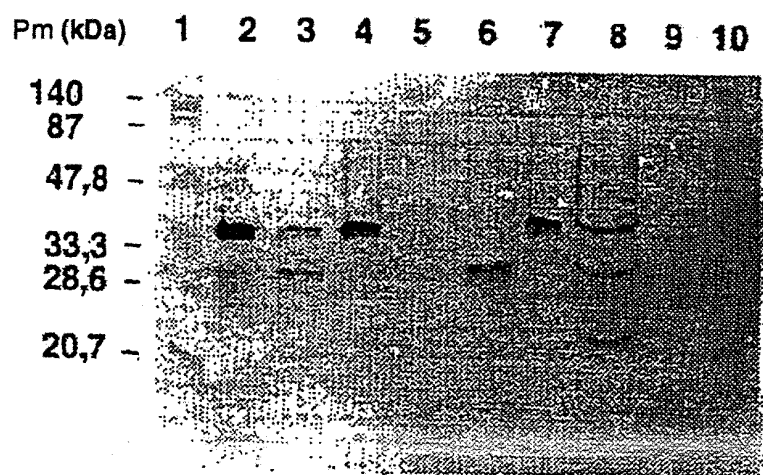


FIGURA 7B

Xilanasa de 35 kDa

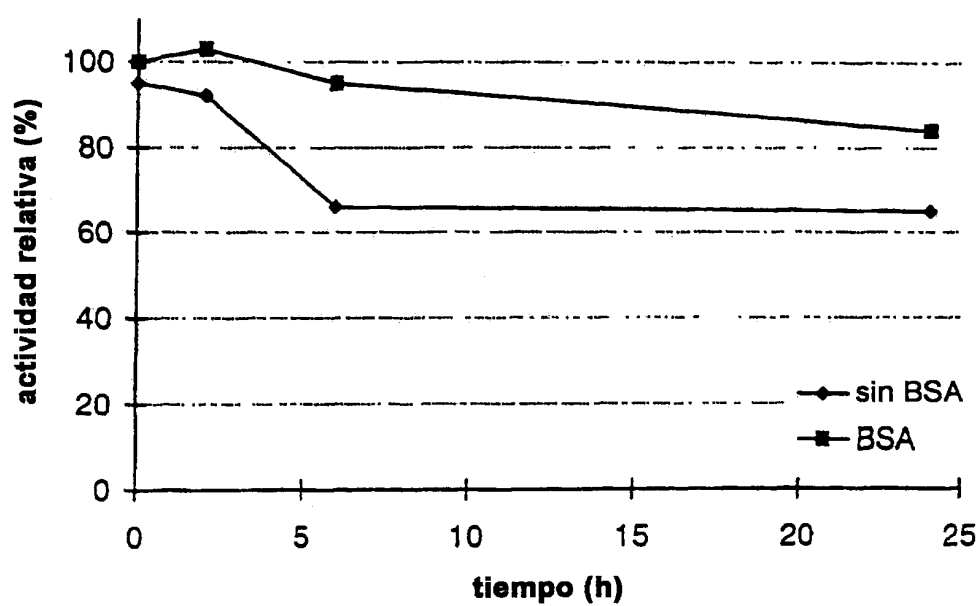


FIGURA 8

50 kDa xylanase

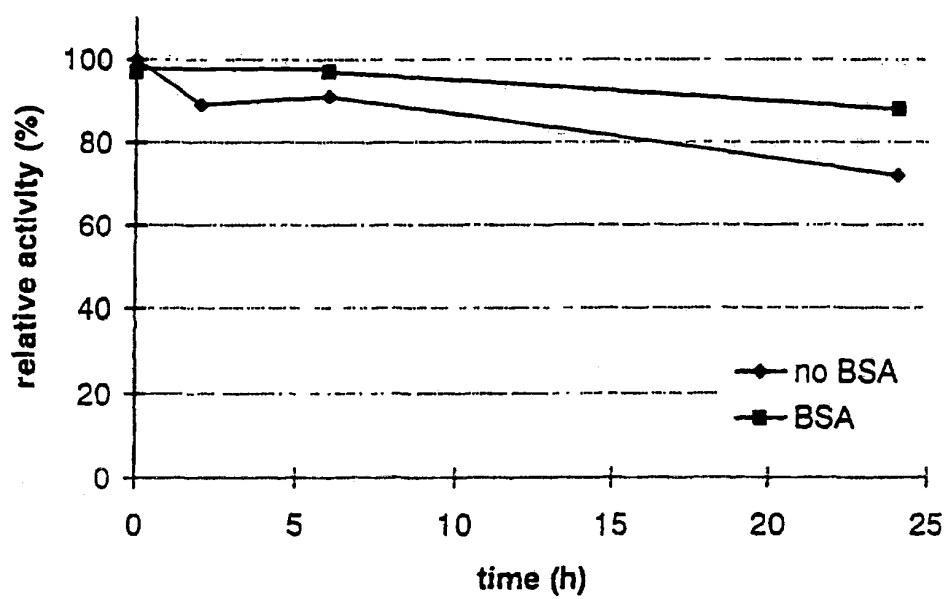


FIGURE 9

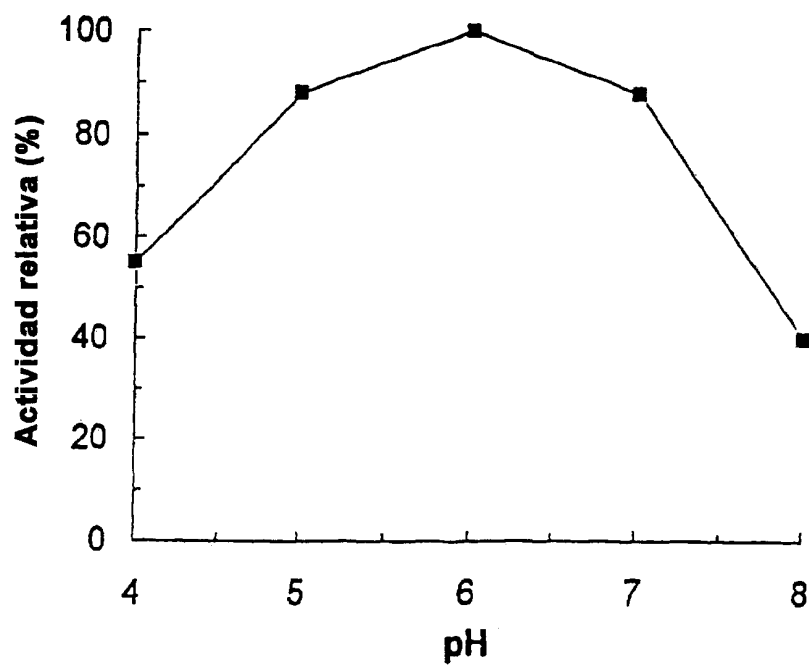


FIGURA 10A

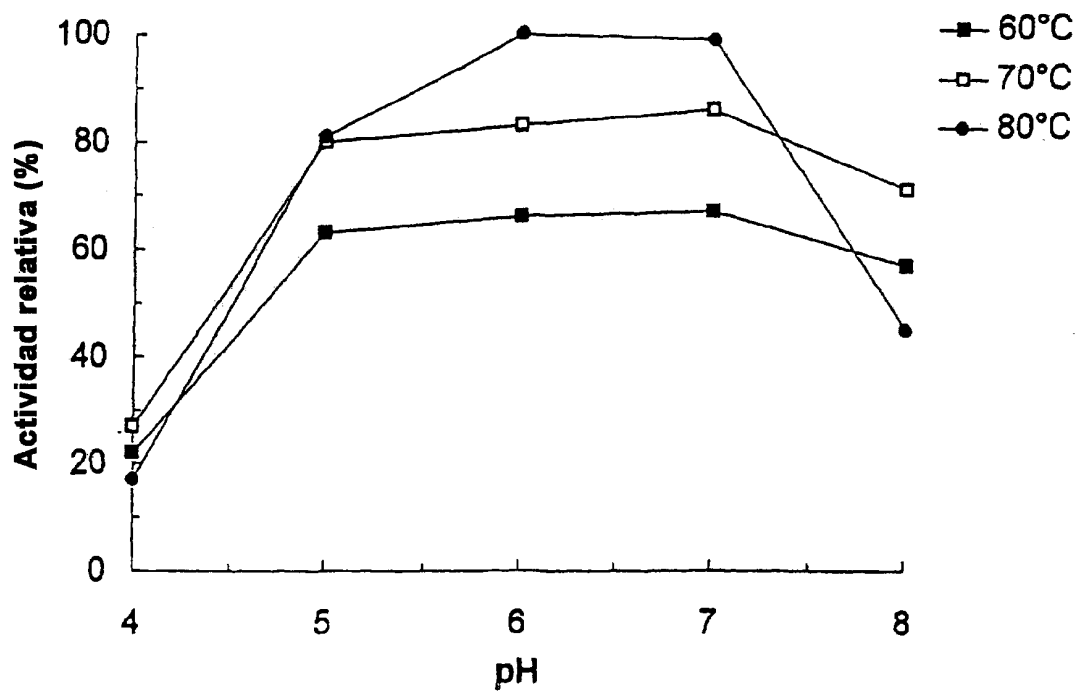


FIGURA 10B

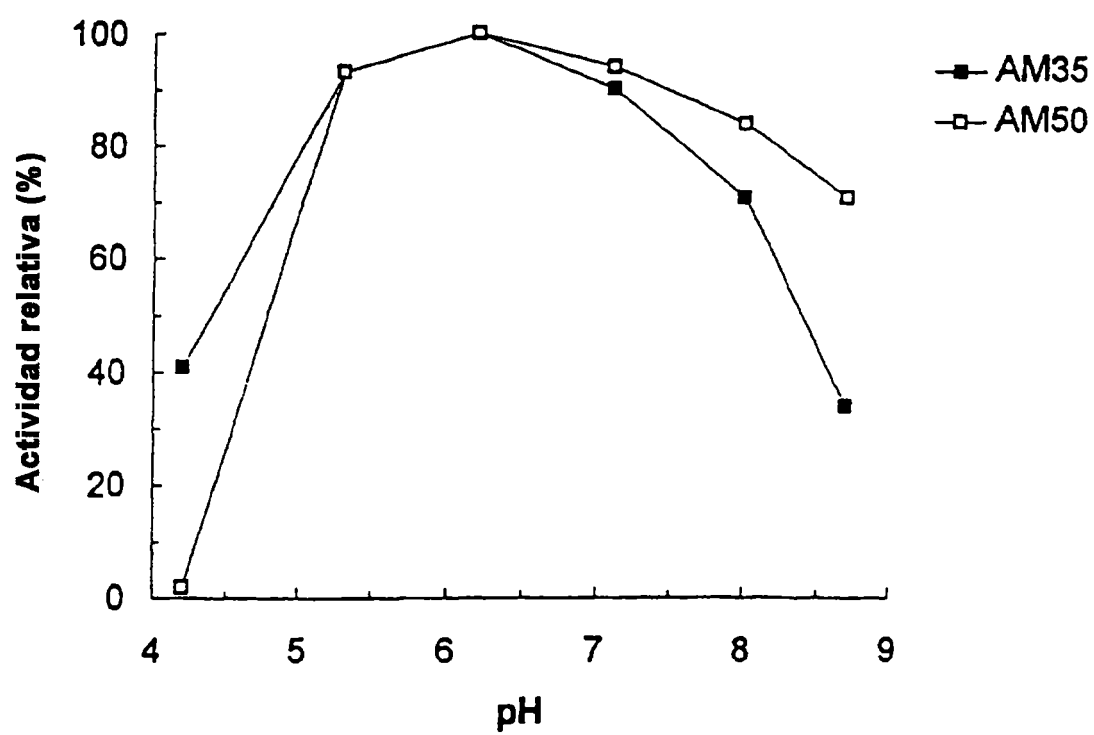


FIGURA 10C

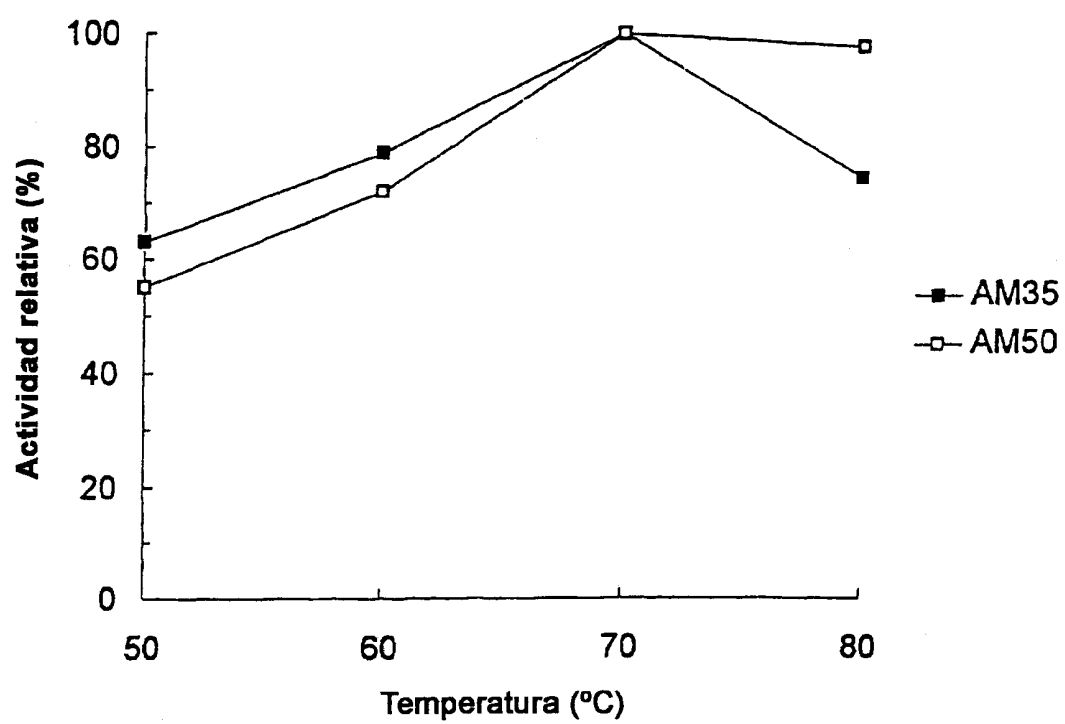


FIGURA 11

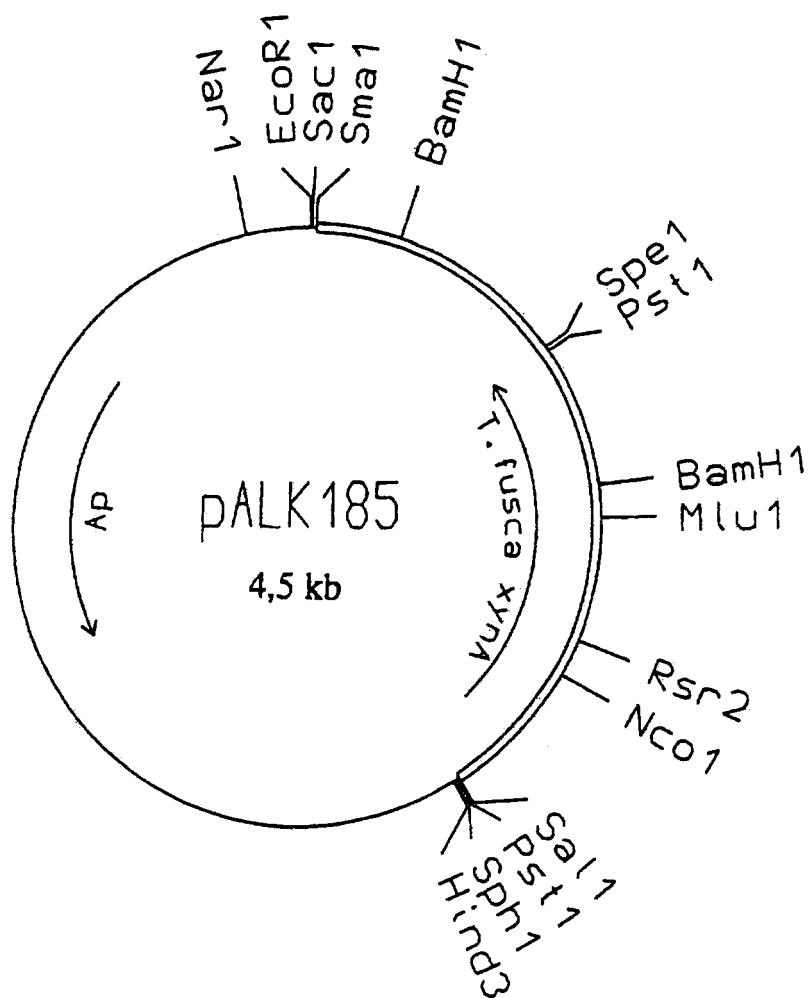


FIGURA 12

1	CCCGGGTATTCATGTGAATGATTAGCAACAGTTATGTTACGGAGATATTTCTGAGAGTGTTCACAGGTCGTGAAGTCGGT	80
81	CCGATACTTTTCGAGCTAGCTCCGATAGTTTTTCGATACGCCGGCACATCGAGCAAGTCGGACGAGTACGCGCCACGTCGG	160
161	TTTTCCGCCGCACCCCGCGCAGAGCGGCCGGAGAAACCCCGCGTGTCCGCGCATCGGTGCCGGTCCCTCGTTCGCGCCG	240
241	GACCGCGCGCGCGGTGCGGACAGCCAGCCCCATCGGCCCTTCTTCAGAGGAAGCGGTACATGAACGAACCCCTCACCC M N E P L T	320
321	ATCACGCGAGGCCAGGCCGCCGACAGCCCTCGGCCCTCGGGCGCATCGTCACCAAGTCCCTTCGCCCTGGCACTCGCCATCGC I T Q A R R R R R L G L R R I V T S A F A L A L A I A	400
401	CGGTGCGCTGCTGCCCGGCACGGCCACGCCGACACCACCATCACCCAGAACCAGACCGGGTACGACAACGGGTACTTCT G A L L P G T A H A D T T I T Q N Q T G Y D N G Y F Y	480
481	ACTCGTTCTGGACCGACGCCGCCGGGACCGTCTCCATGACCTCCACTCGGGCGGCAGCTACAGCACCTCGTGGCGGAAC S F W T D A P G T V S H T L H S G G S Y S T S W R N	560
561	ACCGGGAACCTTCGTGCCCGGCAAGGGCTGGTCCACCTCGGGGACGGCGGACCGTGACCTACAACGCCCTCCTTCAACCGGTC T G N F V A G K G W S T G G R R T V T Y N A S F N P S	640
641	GGGTAAACGGCTACCTCACGCTCTACGGCTGGACCAAGAACCCGCTCGTGCAGTACTACATCGTCGAGAGCTGGGGCACCT G N G Y L T L Y G W T R N P L V E Y Y I V E S W G T Y	720
721	ACCGGCCACCGCGCACCTACAAGGGCACCGTCAACACCGACGGGGGAACGTACGACATCTACGAGACCTGGCGGTACAAC R P T G T Y K G T V T T D G G T Y D I Y E T W R Y N	800
801	GCGCGCTCCATCGAGGGCAACCGGACCTTCCAGCAGTTCTGGAGCGTCCGGCAGCAGAAGCGGACCGGCACCATCAC A P S I E G T R T F Q Q F W S V R Q Q K R T S G T I T	880
881	CATCGGCAACCACTTCGACGCCCTGGGCCCGCGCCGGCATGAACCTGGGCAAGCCAGCTACAGATCATGGCGACCGAGG I G N H F D A W A R A G M N L G S H D Y Q I M A T E G	960
961	GCTACCAGAGCAGCGGTAGCTCCACCGTCTCCATCAGCGAGGGTGGCAACCCCGGCAACCCGGTAAACCCCGGCAACCCC Y Q S S G S S T V S I S E G G N P G N P G N P G N P	1040
1041	GGCAACCCCGGTAACCCGGGTAACCCCGCGGTGGCTGGTGGCGACCTCTCCGCGGGCCAGCAGTGGAGCGGACCGCTA G N P G N P G N P G G G C V A T L S A G Q Q W S D R Y	1120
1121	CAACCTCAAGCTCTCGGTGAGCGGCTCGAACAACCTGGACGGTCCGGATGGAGCTGCCCTACCCGGGCCCGCATCATGCCA N L N V S V S G S N N W T V R H D V P Y P A R I I A T	1200
1201	CCTGGAACATCCACGCCAGTGGCCCGAGTCCAGGTGCTCATCGCCAGACCCCAACGGCAACGGCAACCACTGGGGCGTG W N I H A Q W P E S Q V L I A R P N G N G N N W G V	1280
1281	ACGATCCAGCACAAACGGCAACTGGACCTGGCCGAGGGTCACCTGTACCGGCAACTGAGTTCGCCGCCCAAGGTGGCGC T I Q H N G N W T W P T V T C T A N *	1360
1361	GGCGGCTCCCGGCCG	1375

FIGURA 13

ES 2 301 174 T3

```

1  TTGGGCAGCCTATTGACAAATTTCGTGAATGTTCCACACTTGCTCTGCAGACGGCCCGCCGATCATGGGTGCACCGG  80

81  TCGGCGGGACCGTGCTCCGACGCCATTCCGGGGGTGTGCCCTGCGGGCGCGGCGTCGATCCCGGGGGACTCCCGCGGTT  160

161  CCCTTTCCGTGTCCCTCTAATGGAGGCTCAGGCATGGGCGTGAACGCTTCCCCAGACCCGGAGCTCGGCGGTTCACCGG  240
      M G V N A F P R P G A R R F T G

241  CCGGCTGTACCGGGCCCTGGCGCGCGCCACGGTGAGCGTGGTCCGCGTGGTCAACGCGCTGACGGTGACCCAGCCCGCCA  320
      G L Y R A L A A A T V S V V G V V T A L T V T Q P A S

321  GCGCCCGGCGAGCAGCTCCGCGAGGGTGCCGCGCAGCACAACCGGTACTTCGGCGTGGCCATCGCCGGAACAGGCTC  400
      A A A S T L A E G A A Q H N R Y F G V A I A A N R L
      <----- péptido N° 1696----->----- péptido N° 1697----->-----

401  ACCGACTCGGTCTACACCAACATCGCGAACCCGAGTTCAACTCGGTGACGCGCGAGAACGAGATGAAGATCGACGCCAC  480
      T D S V Y T N I A N R E F N S V T A E N E M K I D A T
      ----- péptido N° 1698----->----- péptido N° 1704----->-----

481  CGAGCCGAGCAGGGCGGTTGCACTTCACCCAGGCCGACCGGATCTACAACCTGGCGCGCCAGAACGGCAAGCAGGTCC  560
      E P Q Q G R F D F T Q A D R I Y N W A R Q N G K Q V R

561  GCGGCCACACCTGGCCTGGCACTCGCAGCAGCCGAGTGGATGCAGAACCTCAGCGGCCAGGCGCTGCCCGAGGCGATG  640
      G H T L A W H S Q Q P Q W M Q N L S G Q A L R Q A M

641  ATCAACACATCCAGGGGGTATGTCTACTACCGGGGCAAGATCCCGATCTGGGACGTGGTGAACGAGGCGTTCGAGGA  720
      I N H I Q G V M S Y Y R G K I P I W D V V N E A F E D

721  CGGAACCTCCGGCGCGCGGTCCGACTCCAACCTCCAGCGCACCGGTAACGATTGGATCGAGGTCGCGTTCGACCCGCC  800
      G N S G R R C D S N L Q R T G N D W I E V A F R T A R

801  GCCAGGGGACCCCTCGGCCAAGCTCTGCTACAACGACTACAACATCGAGAACCTGGAACCGCGCCAGAGCCAGGCGGT  880
      Q G D P S A K L C Y N D Y N I E N W N A A K T Q A V
      <-----

881  TACAACATGGTGGGGACTTCAAGTCCCGCGCGGTGCCATCGACTGCGTGGGCTCCAGTCGCACTTCAACAGCGGTAA  960
      Y N M V R D F K S R G V P I D C V G F Q S H F N S G N
      -péptido N° 1703---->

961  CCGGTACAACCCGAATTCGCGCACACCTGCAAGCAGTTCGCGGCCCTCGGCGTGGACGTTCGAGGTCAACGAGCTGGACA  1040
      P Y N P N F R T T L Q Q F A A L G V D V E V T E L D I

1041  TCGAGAACGCCCCGCGCCAGACCTACGCCAGCGTGATCCGGGACTGCTTGGCGGTGGACCGGTGCACCGGCATCACCGTC  1120
      E N A P A Q T Y A S V I R D C L A V D R C T G I T V
      <---- péptido N° 1699

1121  TGGGGTGTCCGCGACGCGACTCCTGGCGCTCGTACCAGAACCGGTGCTGTTTCGACAAACAGGCAACAAGAAGCAGGC  1200
      W G V R D S D S W R S Y Q N P L L F D N N G N K K Q A
      ----->

```

FIGURA 14

ES 2 301 174 T3

1201 CTACTACGGGTGCTCGACCCCTGAACGAGGGCTCCGACGACGGTGGCGCCCGTCCACCGCGGGTCTCGCGCGCGC 1280
Y Y A V L D A L N E G S D D G G G P S N P P V S P P P

1281 CGGGTGGCGGTTCGGGCGAGATCCGGGGGTGGGCTCCAACCGGTGCATCGACGTGCCGACCGCAACACCGCGACGGC 1360
G G G S G Q I R G V A S N R C I D V P N G N T A D G

1361 ACCCAGGTCCAGCTGTACGACTGCCACAGCGGTCCAACAGCAGTGGACCTACACCTCGTCGGGTGAGTTCGGCATCTT 1440
T Q V Q L Y D C H S G S N Q Q W T Y T S S G E F R I F

1441 CGGCAACAAGTGCCTGGACGGGGCGGCTCCAGCAACGGTGGGTCCAGATCTACAGCTGCTGGGGCGGCGCCACCC 1520
G N K C L D A G G S S N G A V V Q I Y S C W G G A N Q

1521 AGAAGTGGGAGCTCCGGGCGGACGGCACCATCGTGGGCGTGCAGTCCGGGCTGTGCCTCGACCGGTGGGTGGCGGCACC 1600
K W E L R A D G T I V G V Q S G L C L D A V G G G T

1601 GGCAACGGCACGGGCTGACGCTCTACTCCTGCTGGGGCGGCAACAACAGAGTGGTCTACAACGCTGATCCCCGGC 1680
G N G T R L Q L Y S C W G G N N Q K W S Y N A *

1681 TGATCGACCCTAGTTGAGGCGGTCTCCGGTACGGCACCGTCCGACCGGAGGCGGTCCCTTGTTCGTCCAGGACGGAAGGA 1760

1761 CCGGTCTGAGCAGGCGCGGATCGGACACCATGGTGGGAGGCACGAAAGCGGGAGGGGTCTGATTCCGAGACTCCGGG 1840

1841 AAGTGGAGGTGTTCCTCCACTGA 1864

FIGURA 14 (CONTINUACIÓN)

ES 2 301 174 T3

[illegible]

FIGURA 15A

ES 2 301 174 T3

	10	20	30	40	50	60
AM50	MGVNAFFPRPGARRFTGGLYRALAAATVSVVGVVLTALVTQPASAAASTLAEGAAQHNRYP					
	: : : : : : : : : : : : : : : : :					
M64551	MGSYALPRSGVRRSIRVL---LAALVVGVLGTATALIAPPGAHAESTLGAAAAQSGRYF					
	10	20	30	40	50	
	70	80	90	100	110	120
AM50	GVAIAANRLTDSVYTNIANREFNSVTAENEMKIDATEPQQGRFDFDQADRIYNWARQNGK					
	: :					
M64551	GTAIASGRLSDSTYTSIAGREFNMVTAENEMKIDATEPQRGQFNFSSADRVYNWAVQNGK					
	60	70	80	90	100	110
	130	140	150	160	170	180
AM50	QVRGHTLAWHSQQPQWMQNLSGQALRQAMINHIQGVMSYYRGKIPWDVVNEAFEDGNSG					
	: :					
M64551	QVRGHTLAWHSQQPGWMQSLSGRPLRQAMIDHINGVMAHYKGKIVQWDVVNEAFADGSSG					
	120	130	140	150	160	170
	190	200	210	220	230	240
AM50	RRCDNLQRTGNDWIEVAFRTARQGDPSAKLCYNDYNIENWNAAKTQAVYNMVRDFKSRG					
	: :					
M64551	ARRDSNLQRSNDWIEVAFRTARAADPSAKLCYNDYNVENWTWAKTQAMYNMVRDFKQRG					
	180	190	200	210	220	230
	250	260	270	280	290	300
AM50	VPIDCVGFQSHFNSGNPYNPNFRITTLQQFAALGVDVEVTELDIENAPAQTYASVIRDCLA					
	: :					
M64551	VPIDCVGFQSHFNSGSPYNSNFRITTLQNFAALGVDVAITELDIQAPASTYANVTNDCLA					
	240	250	260	270	280	290
	310	320	330	340	350	360
AM50	VDRCTGITVWGVDRSDSWRSYQNPLLFNNGNKKQAYYAVLDALNEGSDGGGSPSNPPVS					
	: :					
M64551	VSRCLGITVWGVDRSDSWRSEQTPLLFNNDGSKKAAAYTAVLDAL-----NGGDSSEPP--					
	300	310	320	330	340	350
	370	380	390	400	410	420
AM50	PPPGGGSGQIRGVASNRCIDVPNGNTADGTQVQLYDCHSGSNQQWYTSSGEFRIFGNKC					
	::: :					
M64551	----ADGGQIKGVSGRCLDVPDASTSDGTQLQLWDCHSGTNQQWAATDAGELRVYGDKC					
	360	370	380	390	400	
	430	440	450	460	470	480
AM50	LDAGGSSNGAVVQIYSCWGGANQKWL RADGTIVGVQSGLCCLDAVGGGTGNGTRLQLYSC					
	: :					
M64551	LDAAGTSNGSKVQIYSCWGGDNQKWLNSDGSVVGVSGLCCLDAVGNGTANGTLIQLYTC					
	410	420	430	440	450	460
	490					
AM50	WGGNNQKWSYNA					
	: : : : :					
M64551	SNGSNQRWTRT					
	470					

FIGURA 15B

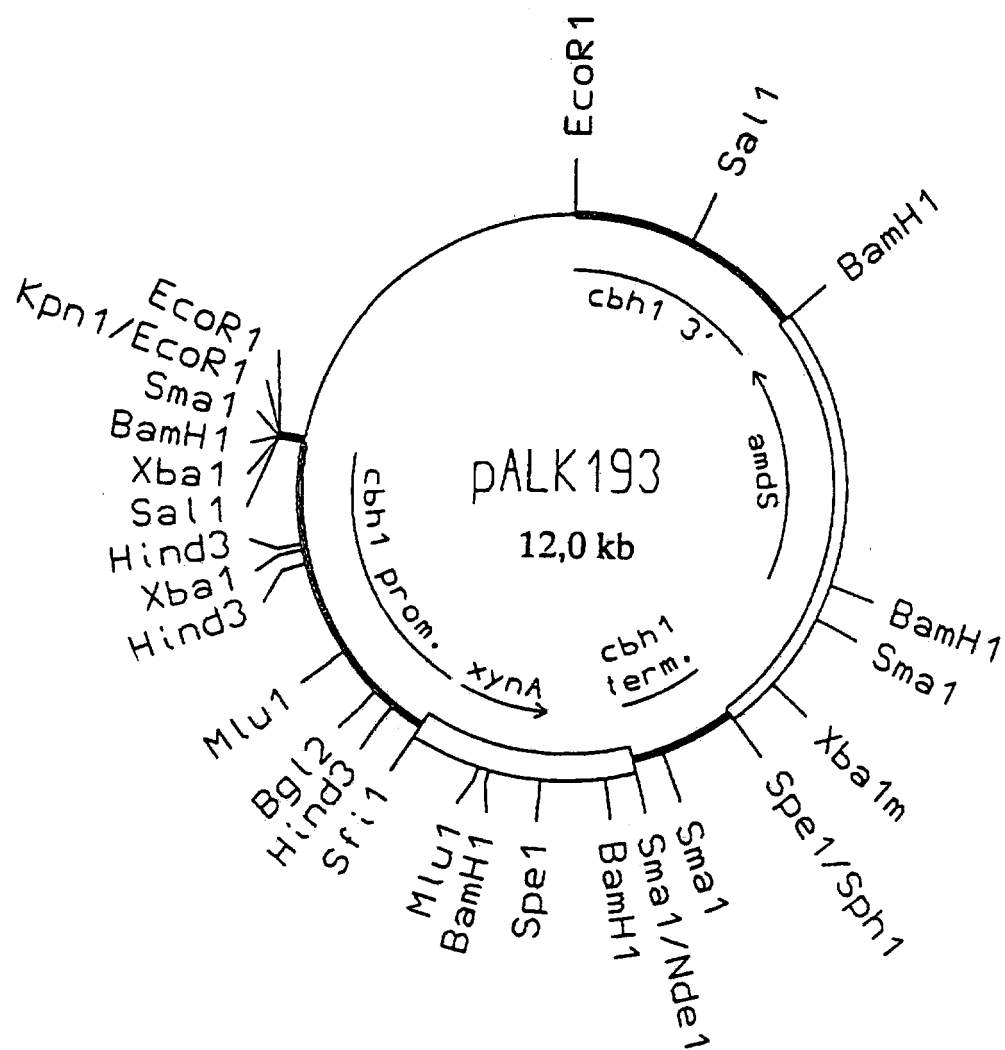


FIGURA 16

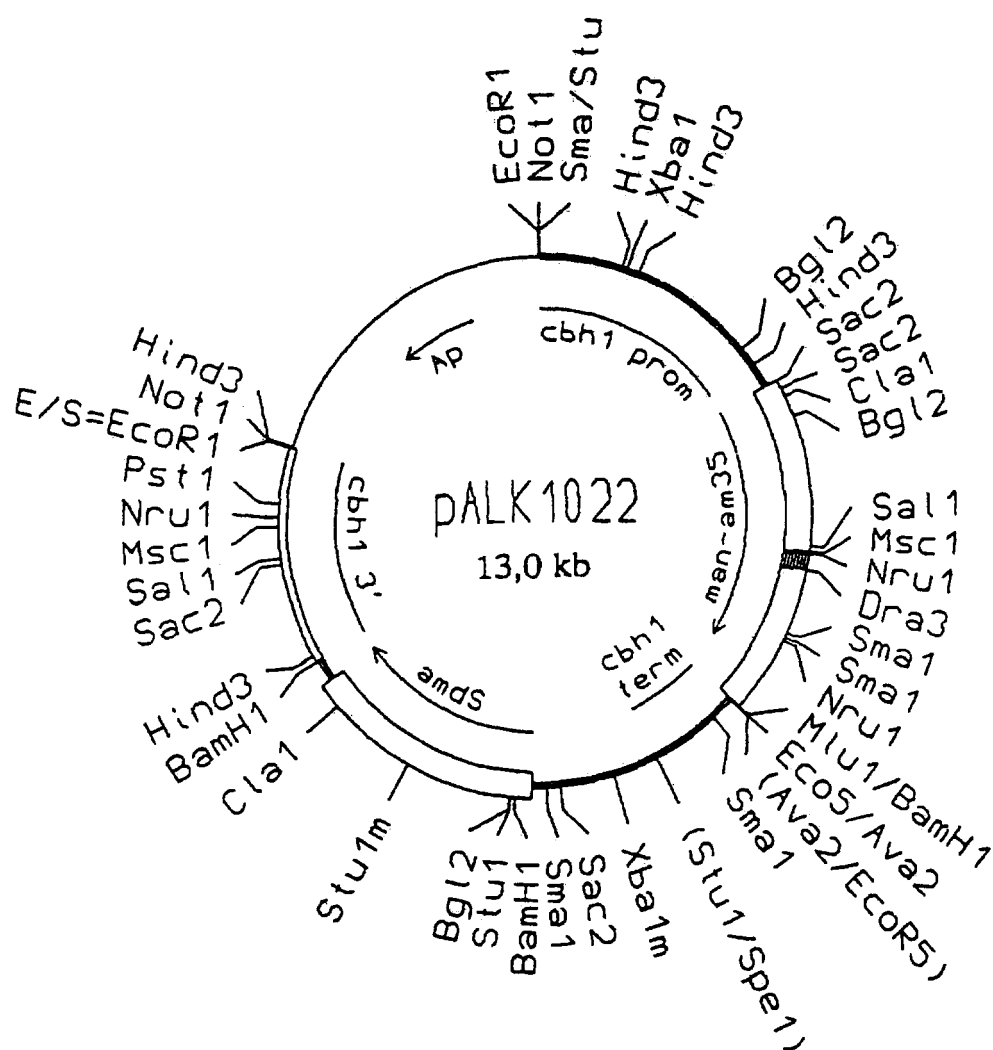


FIGURA 17

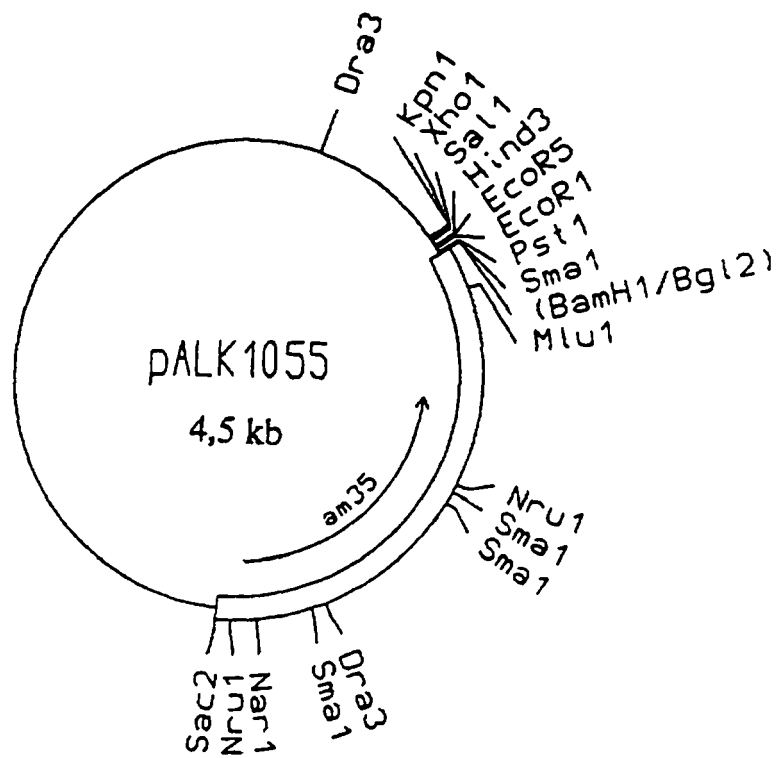


FIGURA 18

SECUENCIAS DE ADN DE LAS FUSIONES ENTRE LA REGIÓN CENTRAL/BISAGRA DE MANI Y EL GEN DE AM35

pALK945

MAN...T	GGT	CGC	GAC	ACC	ACC...AM35	(SEC ID N°: 11:)
	G	R	D	T	T	(SEC ID N°: 12:)
secuencia <i>man1</i>	secuencia <i>AM35</i>					

pALK948

MAN...T	GGT	CGC	GAC	AAG	CGC	GAC	ACC	ACC...AM35	(SEC ID N°: 13:)
	G	R	D	K	R	D	T	T	(SEC ID N°: 14:)
	engarce KEX2								
secuencia <i>man1</i>	secuencia <i>AM35</i>								

pALK1021

MAN...T	GGC	CAG	TGT	GGA	GGT	GAC	ACC	ACC	ATC	ACC	CAG	AAC...AM35
	G	Q	C	G	G	D	T	T	I	T	Q	N
	secuencia <i>man1</i>					secuencia <i>AM35</i>						
												(SEC ID N°: 15:)
												(SEC ID N°: 16:)

pALK1022

MAN...T	GGC	CAG	TGT	GGA	GGT	CGC	GAC	AAG	CGC	GAC	ACC	ACC...AM35
	G	Q	C	G	G	R	D	K	R	D	T	T
	secuencia <i>man1</i>					engarce KEX			secuencia <i>AM35</i>			
												(SEC ID N°: 17:)
												(SEC ID N°: 18:)

FIGURA 19

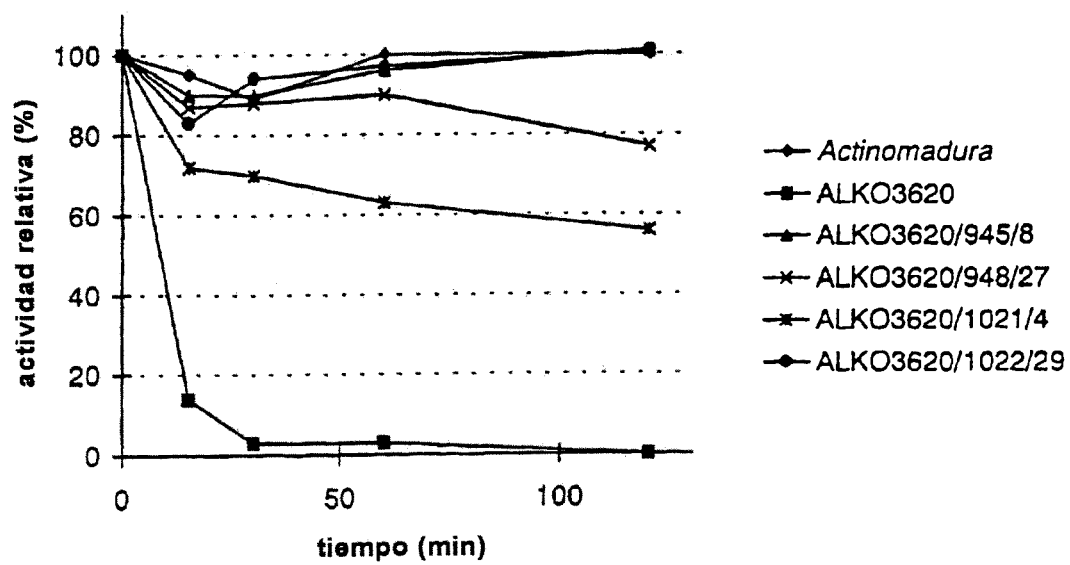


FIGURA 20

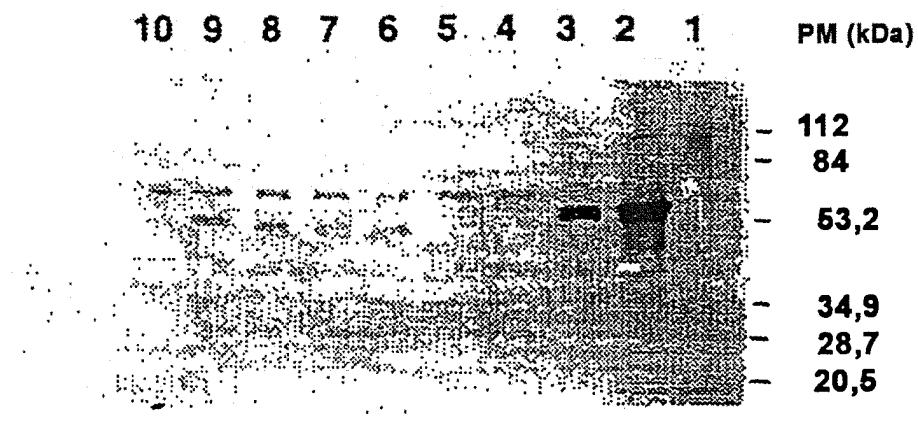


FIGURA 21

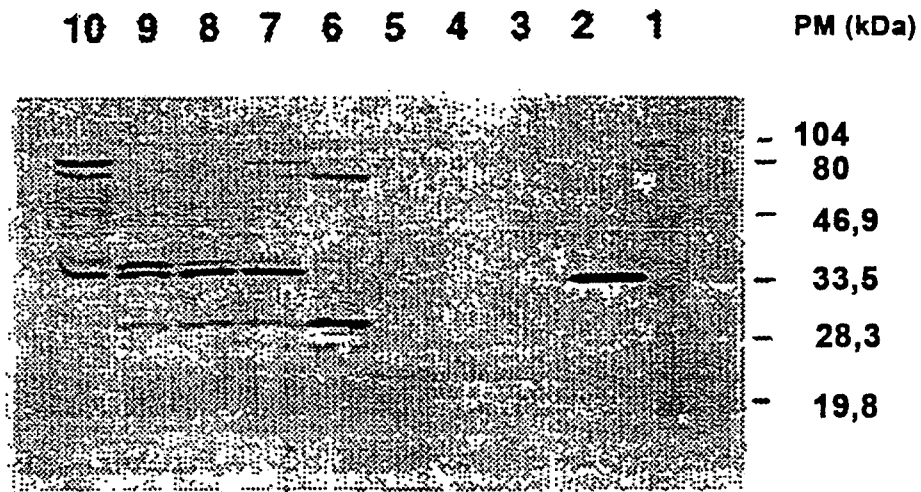


FIGURA 22

CARRIL

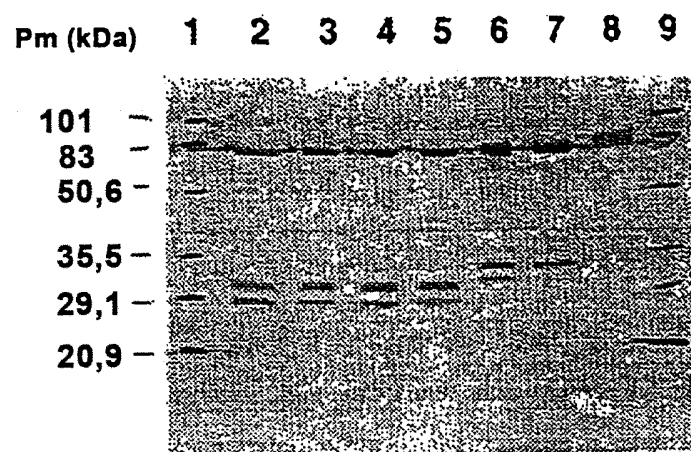


FIGURA 23A

CARRIL

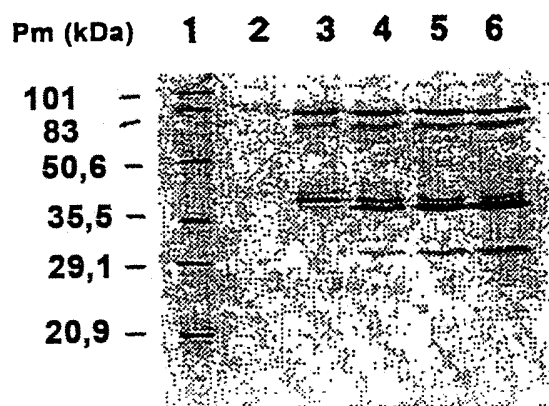


FIGURA 23B

CARRIL

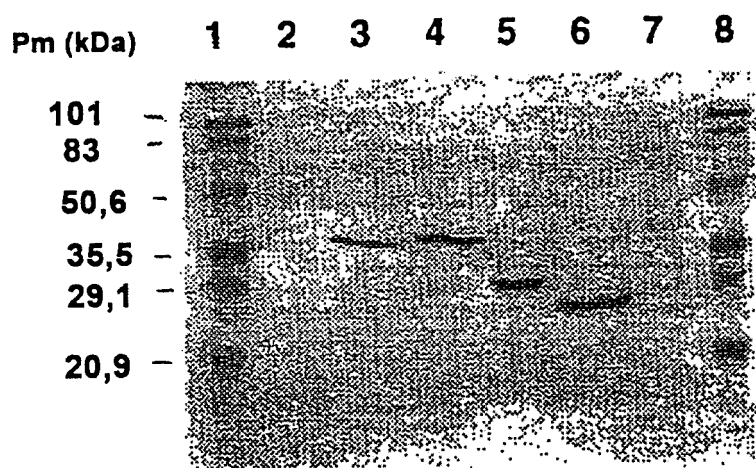


FIGURA 24

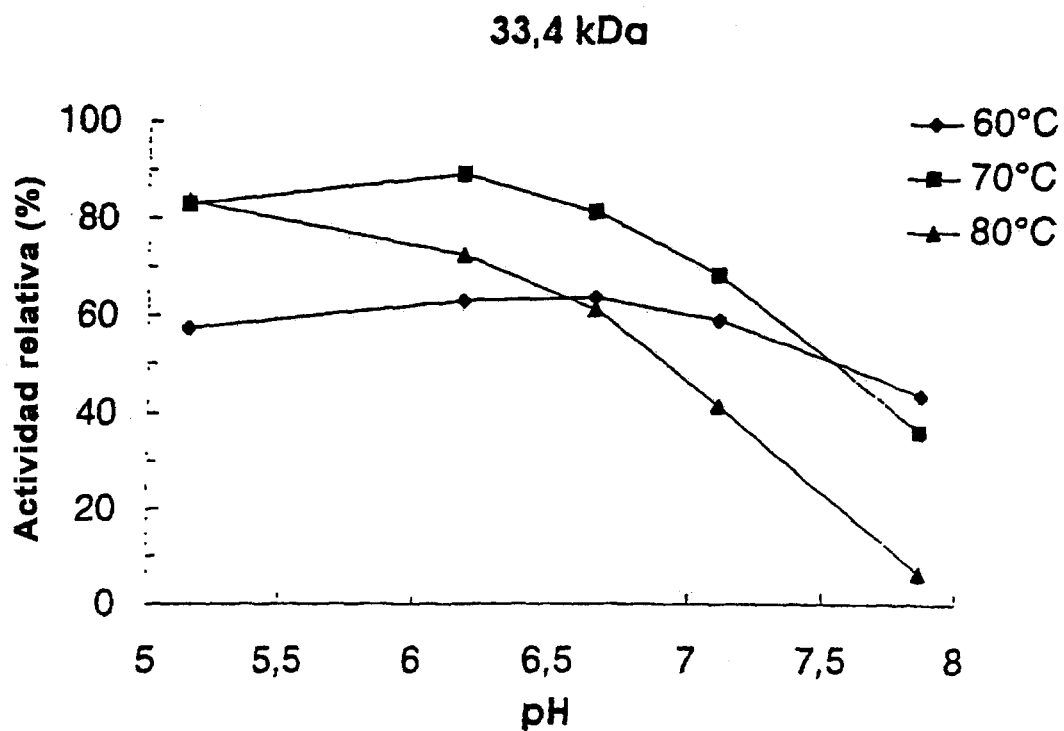


FIGURA 25A

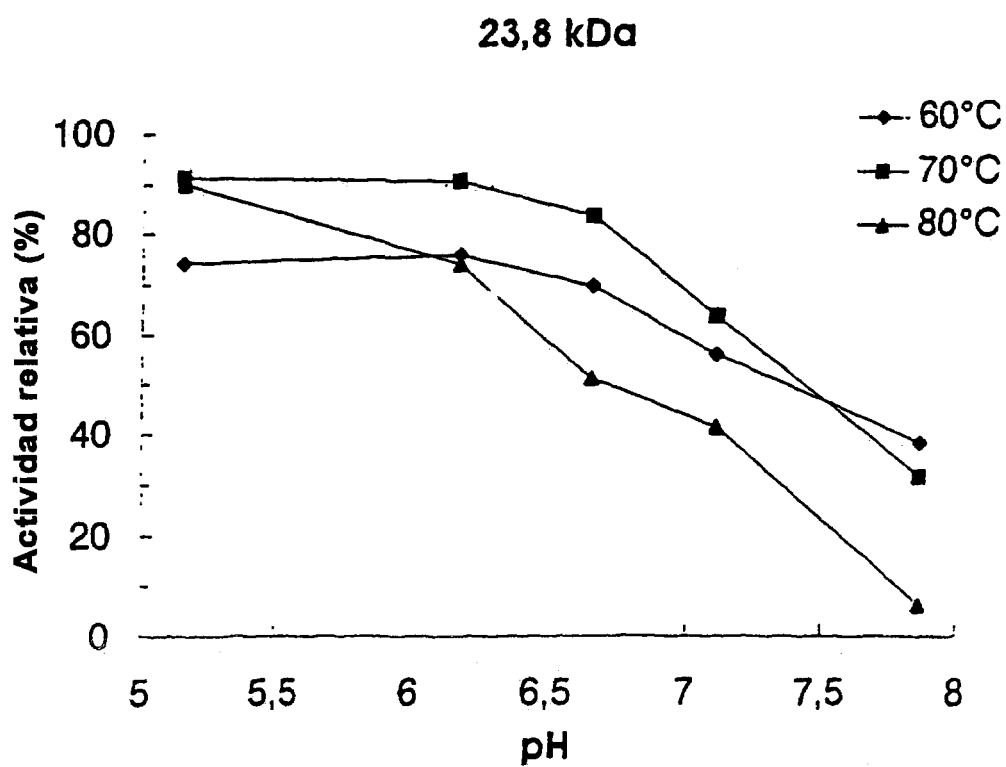


FIGURA 25B

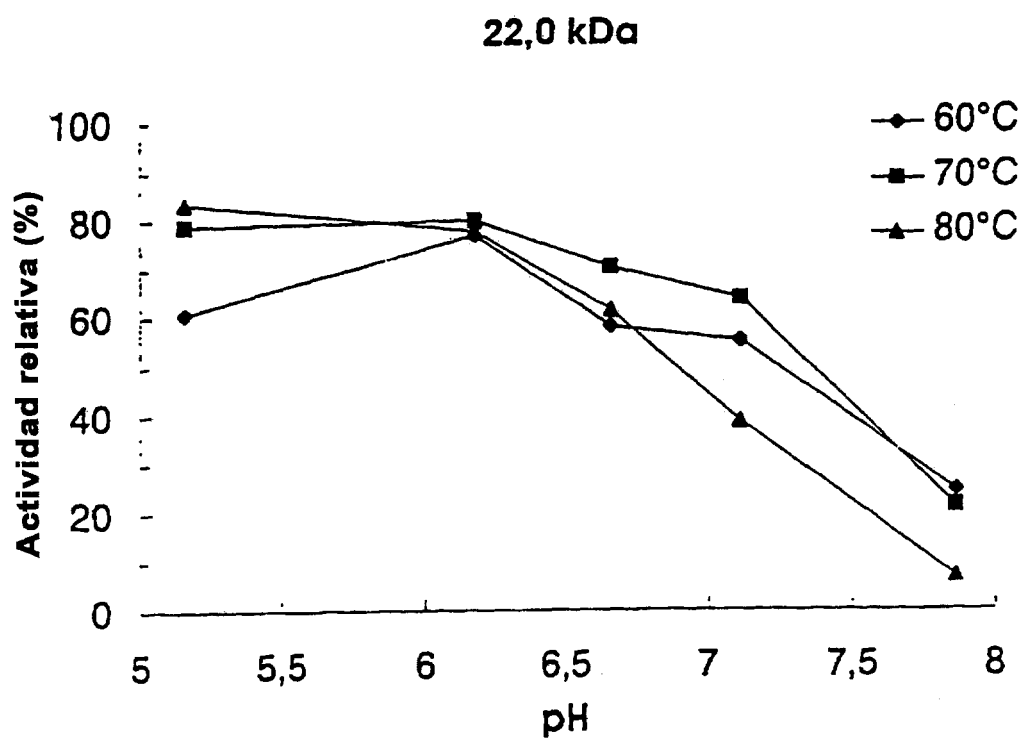


FIGURA 25C

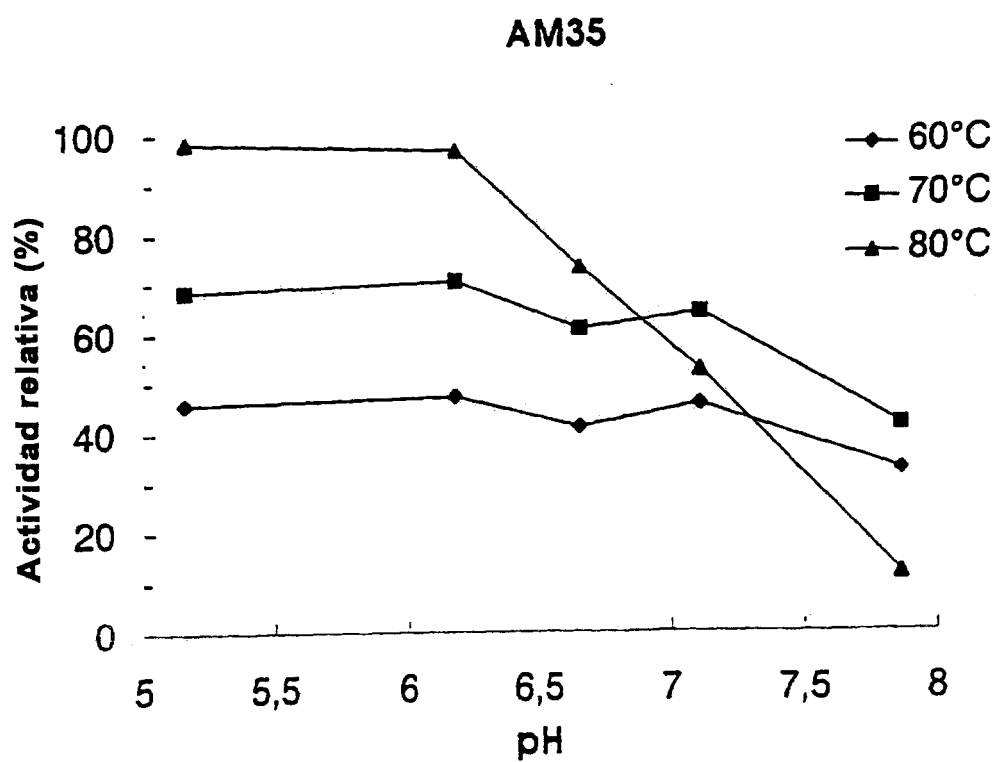


FIGURA 25D

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: Primalco Ltd
- (B) CALLE: Valta-akseli
- (C) CIUDAD: Nurmijarvi
- (E) PAÍS: Finlandia
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): FIN-05200
- (G) TELÉFONO: +358 9 133 11
- (H) TELEFAX: +358 9133 1546

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Producción y Secreción de Proteínas de Origen Bacteriano en Hongos Filamentosos

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 18

(iv) FORMA LEGIBLE EN ORDENADOR:

- (A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible
- (B) ORDENADOR: PC IBM compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: Patent In Release N° 1.0, Versión N° 1.30 (EPO)

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 1

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1375 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Actinomadura flexuosa*
- (B) CEPA: DSM43186

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 303..1337
- (D) OTRA INFORMACIÓN:/producto= "xilanasa AM35"

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N° 1

ES 2 301 174 T3

	CCCCGGTATT CATGTGAATG ATTAGCAACA GTTATGTTAC GGAGATATTT CTGAGAGTGT	60
5	TGACAGGTTCG TGAAGTCGGT CCGATACTTT CGAGCTAGCT CCGATAGTTT TCGATACGCC	120
	GGCACATCGA GCACGTCGGA CGAGTCACGC GCCACGTCGG TTTTCCGCCG CACGCCGCGC	180
10	AGAGCGGCCG GAGAACCCCC GCGTGTCCGC GGCATCGGTG CCGGTCCGTC GTTCGCCGCC	240
	GACCGCGCGC CGGGTCGCGA CACGCCAGCC CCCATCGGCC CTTCTTCACG AGGAAGCCGT	300
15	AC ATG AAC GAA CCC CTC ACC ATC ACG CAG GCC AGG CGC CGC AGA CGC Met Asn Glu Pro Leu Thr Ile Thr Gln Ala Arg Arg Arg Arg Arg	347
	1 5 10 15	
20	CTC GGC CTC CGG CGC ATC GTC ACC AGT GCC TTC GCC CTG GCA CTC GCC Leu Gly Leu Arg Arg Ile Val Thr Ser Ala Phe Ala Leu Ala Leu Ala	395
	20 25 30	
25	ATC GCC GGT GCG CTG CTG CCC GGC ACG GCC CAC GCC GAC ACC ACC ATC Ile Ala Gly Ala Leu Leu Pro Gly Thr Ala His Ala Asp Thr Thr Ile	443
	35 40 45	
30	ACC CAG AAC CAG ACC GGG TAC GAC AAC GGC TAC TTC TAC TCG TTC TGG Thr Gln Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser Phe Trp	491
	50 55 60	
35	ACC GAC GCG CCC GGG ACC GTC TCC ATG ACC CTC CAC TCG GGC GGC AGC Thr Asp Ala Pro Gly Thr Val Ser Met Thr Leu His Ser Gly Gly Ser	539
	65 70 75	
40	TAC AGC ACC TCG TGG CGG AAC ACC GGG AAC TTC GTC GCC GGC AAG GGC Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val Ala Gly Lys Gly	587
	80 85 90 95	
45	TGG TCC ACC GGG GGA CGG CGG ACC GTG ACC TAC AAC GCC TCC TTC AAC Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn Ala Ser Phe Asn	635
	100 105 110	
50	CCG TCG GGT AAC GGC TAC CTC ACG CTC TAC GGC TGG ACC AGG AAC CCG Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp Thr Arg Asn Pro	683
	115 120 125	
55	CTC GTC GAG TAC TAC ATC GTC GAG AGC TGG GGC ACC TAC CGG CCC ACC Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Thr	731
	130 135 140	
60	GGC ACC TAC AAG GGC ACC GTC ACC ACC GAC GGG GGA ACG TAC GAC ATC Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile	779
	145 150 155	
65	TAC GAG ACC TGG CGG TAC AAC GCG CCG TCC ATC GAG GGC ACC CGG ACC Tyr Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu Gly Thr Arg Thr	827
	160 165 170 175	
	TTC CAG CAG TTC TGG AGC GTC CGG CAG CAG AAG CGG ACC AGC GGC ACC Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg Thr Ser Gly Thr	875
	180 185 190	

ES 2 301 174 T3

5	ATC ACC ATC GGC AAC CAC TTC GAC GCC TGG GCC CGC GCC GGC ATG AAC Ile Thr Ile Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg Ala Gly Met Asn 195 200 205	923
10	CTG GGC AGC CAC GAC TAC CAG ATC ATG GCG ACC GAG GGC TAC CAG AGC Leu Gly Ser His Asp Tyr Gln Ile Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser 210 215 220	971
15	AGC GGT AGC TCC ACC GTC TCC ATC AGC GAG GGT GGC AAC CCC GGC AAC Ser Gly Ser Ser Thr Val Ser Ile Ser Glu Gly Gly Asn Pro Gly Asn 225 230 235	1019
20	CCG GGT AAC CCC GGC AAC CCC GGC AAC CCC GGT AAC CCG GGT AAC CCC Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro 240 245 250 255	1067
25	GGC GGT GGC TGC GTC GCG ACC CTC TCC GCC GGC CAG CAG TGG AGC GAC Gly Gly Gly Cys Val Ala Thr Leu Ser Ala Gly Gln Gln Trp Ser Asp 260 265 270	1115
30	CGC TAC AAC CTC AAC GTC TCG GTC AGC GGC TCG AAC AAC TGG ACG GTC Arg Tyr Asn Leu Asn Val Ser Val Ser Gly Ser Asn Asn Trp Thr Val 275 280 285	1163
35	CGG ATG GAC GTG CCC TAC CCG GCC CGC ATC ATC GCC ACC TGG AAC ATC Arg Met Asp Val Pro Tyr Pro Ala Arg Ile Ile Ala Thr Trp Asn Ile 290 295 300	1211
40	CAC GCC CAG TGG CCC GAG TCC CAG GTG CTC ATC GCC AGA CCC AAC GGC His Ala Gln Trp Pro Glu Ser Gln Val Leu Ile Ala Arg Pro Asn Gly 305 310 315	1259
45	AAC GGC AAC AAC TGG GGC GTG ACG ATC CAG CAC AAC GGC AAC TGG ACC Asn Gly Asn Asn Trp Gly Val Thr Ile Gln His Asn Gly Asn Trp Thr 320 325 330 335	1307
50	TGG CCG ACG GTC ACC TGT ACC GCG AAC TGA GTTCCCGCCC CCAAAGGTGG Trp Pro Thr Val Thr Cys Thr Ala Asn * 340 345	1357
	CGCGGCGGCT CCCGGCCG	1375

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 2

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 345 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N° 2

ES 2 301 174 T3

	Met	Asn	Glu	Pro	Leu	Thr	Ile	Thr	Gln	Ala	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Leu
	1				5				10						15	
5	Gly	Leu	Arg	Arg	Ile	Val	Thr	Ser	Ala	Phe	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Ile
			20						25					30		
	Ala	Gly	Ala	Leu	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	His	Ala	Asp	Thr	Thr	Ile	Thr
10			35				40					45				
	Gln	Asn	Gln	Thr	Gly	Tyr	Asp	Asn	Gly	Tyr	Phe	Tyr	Ser	Phe	Trp	Thr
	50					55						60				
15	Asp	Ala	Pro	Gly	Thr	Val	Ser	Met	Thr	Leu	His	Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr
	65					70					75				80	
	Ser	Thr	Ser	Trp	Arg	Asn	Thr	Gly	Asn	Phe	Val	Ala	Gly	Lys	Gly	Trp
20					85					90					95	
	Ser	Thr	Gly	Gly	Arg	Arg	Thr	Val	Thr	Tyr	Asn	Ala	Ser	Phe	Asn	Pro
			100					105						110		
25	Ser	Gly	Asn	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Tyr	Gly	Trp	Thr	Arg	Asn	Pro	Leu
		115						120					125			
	Val	Glu	Tyr	Tyr	Ile	Val	Glu	Ser	Trp	Gly	Thr	Tyr	Arg	Pro	Thr	Gly
30		130					135					140				
	Thr	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	Asp	Gly	Gly	Thr	Tyr	Asp	Ile	Tyr
35	145					150					155				160	
	Glu	Thr	Trp	Arg	Tyr	Asn	Ala	Pro	Ser	Ile	Glu	Gly	Thr	Arg	Thr	Phe
					165					170					175	
40	Gln	Gln	Phe	Trp	Ser	Val	Arg	Gln	Gln	Lys	Arg	Thr	Ser	Gly	Thr	Ile
				180					185					190		
	Thr	Ile	Gly	Asn	His	Phe	Asp	Ala	Trp	Ala	Arg	Ala	Gly	Met	Asn	Leu
45			195					200					205			
	Gly	Ser	His	Asp	Tyr	Gln	Ile	Met	Ala	Thr	Glu	Gly	Tyr	Gln	Ser	Ser
	210					215						220				
50	Gly	Ser	Ser	Thr	Val	Ser	Ile	Ser	Glu	Gly	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro
	225					230					235					240
	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly
55					245				250						255	
	Gly	Gly	Cys	Val	Ala	Thr	Leu	Ser	Ala	Gly	Gln	Gln	Trp	Ser	Asp	Arg
				260					265					270		
60	Tyr	Asn	Leu	Asn	Val	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Asn	Asn	Trp	Thr	Val	Arg
			275					280					285			
65	Met	Asp	Val	Pro	Tyr	Pro	Ala	Arg	Ile	Ile	Ala	Thr	Trp	Asn	Ile	His
	290						295					300				

ES 2 301 174 T3

Ala Gln Trp Pro Glu Ser Gln Val Leu Ile Ala Arg Pro Asn Gly Asn
305 310 315 320

Gly Asn Asn Trp Gly Val Thr Ile Gln His Asn Gly Asn Trp Thr Trp
325 330 335

Pro Thr Val Thr Cys Thr Ala Asn *
340 345

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 3

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1864 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Actinomadura flexuosa*
- (B) CEPA: DSM43186

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 194..1672
- (D) OTRA INFORMACIÓN:/producto= "AM50 xilanasa"

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N° 3

TTCGGCAGCC TATTGACAAA TTTCGTGAAT GTTTCACACA CTTGCTCTGC AGACGGCCCC	60
GCCGATCATG GGTGCACCGG TCGGCGGGAC CGTGCTCCGA CGCCATTCGG GGGTGTGCGC	120
CTGCGGGGCGC GGCCTCGATC CCGCGGGGAC TCCC GCGGTT CCCTTCCGT GTCCCTCTAA	180
TGGAGGCTCA GGC ATG GGC GTG AAC GCC TTC CCC AGA CCC GGA GCT CGG	229
Met Gly Val Asn Ala Phe Pro Arg Pro Gly Ala Arg	
350 355	
CGG TTC ACC GGC GGG CTG TAC CGG GCC CTG GCC GCG GCC ACG GTG AGC	277
Arg Phe Thr Gly Gly Leu Tyr Arg Ala Leu Ala Ala Ala Thr Val Ser	
360 365 370	
GTG GTC GGC GTG GTC ACG GCC CTG ACG GTG ACC CAG CCC GCC AGC GCC	325
Val Val Gly Val Val Thr Ala Leu Thr Val Thr Gln Pro Ala Ser Ala	
375 380 385	
GCG GCG AGC ACG CTC GCC GAG GGT GCC GCG CAG CAC AAC CGG TAC TTC	373
Ala Ala Ser Thr Leu Ala Glu Gly Ala Ala Gln His Asn Arg Tyr Phe	
390 395 400 405	

ES 2 301 174 T3

	GGC GTG GCC ATC GCC GCG AAC AGG CTC ACC GAC TCG GTC TAC ACC AAC	421
	Gly Val Ala Ile Ala Ala Asn Arg Leu Thr Asp Ser Val Tyr Thr Asn	
	410 415 420	
5	ATC GCG AAC CGC GAG TTC AAC TCG GTG ACG GCC GAG AAC GAG ATG AAG	469
	Ile Ala Asn Arg Glu Phe Asn Ser Val Thr Ala Glu Asn Glu Met Lys	
	425 430 435	
10	ATC GAC GCC ACC GAG CCG CAG CAG GGG CGG TTC GAC TTC ACC CAG GCC	517
	Ile Asp Ala Thr Glu Pro Gln Gln Gly Arg Phe Asp Phe Thr Gln Ala	
	440 445 450	
15	GAC CGG ATC TAC AAC TGG GCG CGC CAG AAC GGC AAG CAG GTC CGC GGC	565
	Asp Arg Ile Tyr Asn Trp Ala Arg Gln Asn Gly Lys Gln Val Arg Gly	
	455 460 465	
20	CAC ACC CTG GCC TGG CAC TCG CAG CAG CCG CAG TGG ATG CAG AAC CTC	613
	His Thr Leu Ala Trp His Ser Gln Gln Pro Gln Trp Met Gln Asn Leu	
	470 475 480 485	
25	AGC GGC CAG GCG CTG CGC CAG GCG ATG ATC AAC CAC ATC CAG GGG GTC	661
	Ser Gly Gln Ala Leu Arg Gln Ala Met Ile Asn His Ile Gln Gly Val	
	490 495 500	
30	ATG TCC TAC TAC CGG GGC AAG ATC CCG ATC TGG GAC GTG GTG AAC GAG	709
	Met Ser Tyr Tyr Arg Gly Lys Ile Pro Ile Trp Asp Val Val Asn Glu	
	505 510 515	
35	GCG TTC GAG GAC GGA AAC TCC GGC CGC CGG TGC GAC TCC AAC CTC CAG	757
	Ala Phe Glu Asp Gly Asn Ser Gly Arg Arg Cys Asp Ser Asn Leu Gln	
	520 525 530	
40	CGC ACC GGT AAC GAT TGG ATC GAG GTC GCG TTC CGC ACC GCC CGC CAG	805
	Arg Thr Gly Asn Asp Trp Ile Glu Val Ala Phe Arg Thr Ala Arg Gln	
	535 540 545	
45	GGG GAC CCC TCG GCC AAG CTC TGC TAC AAC GAC TAC AAC ATC GAG AAC	853
	Gly Asp Pro Ser Ala Lys Leu Cys Tyr Asn Asp Tyr Asn Ile Glu Asn	
	550 555 560 565	
50	TGG AAC GCG GCC AAG ACC CAG GCG GTC TAC AAC ATG GTG CGG GAC TTC	901
	Trp Asn Ala Ala Lys Thr Gln Ala Val Tyr Asn Met Val Arg Asp Phe	
	570 575 580	
55	AAG TCC CGC GGC GTG CCC ATC GAC TGC GTG GGC TTC CAG TCG CAC TTC	949
	Lys Ser Arg Gly Val Pro Ile Asp Cys Val Gly Phe Gln Ser His Phe	
	585 590 595	
60	AAC AGC GGT AAC CCG TAC AAC CCG AAC TTC CGC ACC ACC CTG CAG CAG	997
	Asn Ser Gly Asn Pro Tyr Asn Pro Asn Phe Arg Thr Thr Leu Gln Gln	
	600 605 610	
65	TTC GCG GCC CTC GGC GTG GAC GTC GAG GTC ACC GAG CTG GAC ATC GAG	1045
	Phe Ala Ala Leu Gly Val Asp Val Glu Val Thr Glu Leu Asp Ile Glu	
	615 620 625	

ES 2 301 174 T3

5	AAC GCC CCG GCC CAG ACC TAC GCC AGC GTG ATC CGG GAC TGC CTG GCC Asn Ala Pro Ala Gln Thr Tyr Ala Ser Val Ile Arg Asp Cys Leu Ala 630 635 640 645	1093
10	GTG GAC CGC TGC ACC GGC ATC ACC GTC TGG GGT GTC CGC GAC AGC GAC Val Asp Arg Cys Thr Gly Ile Thr Val Trp Gly Val Arg Asp Ser Asp 650 655 660	1141
15	TCC TGG CGC TCG TAC CAG AAC CCG CTG CTG TTC GAC AAC AAC GGC AAC Ser Trp Arg Ser Tyr Gln Asn Pro Leu Leu Phe Asp Asn Asn Gly Asn 665 670 675	1189
20	AAG AAG CAG GCC TAC TAC GCG GTG CTC GAC GCC CTG AAC GAG GGC TCC Lys Lys Gln Ala Tyr Tyr Ala Val Leu Asp Ala Leu Asn Glu Gly Ser 680 685 690	1237
25	GAC GAC GGT GGC GGC CCG TCC AAC CCG CCG GTC TCG CCG CCG CCG GGT Asp Asp Gly Gly Gly Pro Ser Asn Pro Pro Val Ser Pro Pro Pro Gly 695 700 705	1285
30	GGC GGT TCC GGG CAG ATC CGG GGC GTG GCC TCC AAC CGG TGC ATC GAC Gly Gly Ser Gly Gln Ile Arg Gly Val Ala Ser Asn Arg Cys Ile Asp 710 715 720 725	1333
35	GTG CCG AAC GGC AAC ACC GCC GAC GGC ACC CAG GTC CAG CTG TAC GAC Val Pro Asn Gly Asn Thr Ala Asp Gly Thr Gln Val Gln Leu Tyr Asp 730 735 740	1381
40	TGC CAC AGC GGT TCC AAC CAG CAG TGG ACC TAC ACC TCG TCC GGT GAG Cys His Ser Gly Ser Asn Gln Gln Trp Thr Tyr Thr Ser Ser Gly Glu 745 750 755	1429
45	TTC CGC ATC TTC GGC AAC AAG TGC CTG GAC GCG GGC GGC TCC AGC AAC Phe Arg Ile Phe Gly Asn Lys Cys Leu Asp Ala Gly Gly Ser Ser Asn 760 765 770	1477
50	GGT GCG GTG GTC CAG ATC TAC AGC TGC TGG GGC GGC GCC AAC CAG AAG Gly Ala Val Val Gln Ile Tyr Ser Cys Trp Gly Gly Ala Asn Gln Lys 775 780 785	1525
55	TGG GAG CTC CGG GCC GAC GGC ACC ATC GTG GGC GTG CAG TCC GGG CTG Trp Glu Leu Arg Ala Asp Gly Thr Ile Val Gly Val Gln Ser Gly Leu 790 795 800 805	1573
60	TGC CTC GAC GCG GTG GGT GGC GGC ACC GGC AAC GGC ACG CGG CTG CAG Cys Leu Asp Ala Val Gly Gly Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Gln 810 815 820	1621
65	CTC TAC TCC TGC TGG GGC GGC AAC AAC CAG AAG TGG TCC TAC AAC GCC Leu Tyr Ser Cys Trp Gly Gly Asn Asn Gln Lys Trp Ser Tyr Asn Ala 825 830 835	1669

ES 2 301 174 T3

TGA TCCCCGGCTG ATCGACCCTA GTTGAGGCCG TCTCCGGTAC GGCACCGTCG 1722
*

GACCGGAGGC GGTCCCTTGT TCGTCCAGGA CGGAAGGACC GGTCTGAGCA GGC GCGGCGA 1782

TCGGACACCA TGGTGGGAGG CACGAAAGCG GGAGGGGGTC GTATTCCGAG ACTCCGGGAA 1842

GTGGAGGTGT TCCTCCACCT GA 1864

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 4

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 493 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N° 4

Met Gly Val Asn Ala Phe Pro Arg Pro Gly Ala Arg Arg Phe Thr Gly
1 5 10 15

Gly Leu Tyr Arg Ala Leu Ala Ala Thr Val Ser Val Val Gly Val
20 25 30

Val Thr Ala Leu Thr Val Thr Gln Pro Ala Ser Ala Ala Ala Ser Thr
35 40 45

Leu Ala Glu Gly Ala Ala Gln His Asn Arg Tyr Phe Gly Val Ala Ile
50 55 60

Ala Ala Asn Arg Leu Thr Asp Ser Val Tyr Thr Asn Ile Ala Asn Arg
65 70 75 80

Glu Phe Asn Ser Val Thr Ala Glu Asn Glu Met Lys Ile Asp Ala Thr
85 90 95

Glu Pro Gln Gln Gly Arg Phe Asp Phe Thr Gln Ala Asp Arg Ile Tyr
100 105 110

Asn Trp Ala Arg Gln Asn Gly Lys Gln Val Arg Gly His Thr Leu Ala
115 120 125

Trp His Ser Gln Gln Pro Gln Trp Met Gln Asn Leu Ser Gly Gln Ala
130 135 140

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

Arg Gly Lys Ile Pro Ile Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Phe Glu Asp
165 170 175

ES 2 301 174 T3

	Gly	Asn	Ser	Gly	Arg	Arg	Cys	Asp	Ser	Asn	Leu	Gln	Arg	Thr	Gly	Asn	
				180					185					190			
5	Asp	Trp	Ile	Glu	Val	Ala	Phe	Arg	Thr	Ala	Arg	Gln	Gly	Asp	Pro	Ser	
			195					200					205				
10	Ala	Lys	Leu	Cys	Tyr	Asn	Asp	Tyr	Asn	Ile	Glu	Asn	Trp	Asn	Ala	Ala	
		210					215					220					
15	Lys	Thr	Gln	Ala	Val	Tyr	Asn	Met	Val	Arg	Asp	Phe	Lys	Ser	Arg	Gly	
	225					230					235					240	
20	Val	Pro	Ile	Asp	Cys	Val	Gly	Phe	Gln	Ser	His	Phe	Asn	Ser	Gly	Asn	
				245						250					255		
25	Pro	Tyr	Asn	Pro	Asn	Phe	Arg	Thr	Thr	Leu	Gln	Gln	Phe	Ala	Ala	Leu	
				260					265					270			
30	Gly	Val	Asp	Val	Glu	Val	Thr	Glu	Leu	Asp	Ile	Glu	Asn	Ala	Pro	Ala	
		275						280					285				
35	Gln	Thr	Tyr	Ala	Ser	Val	Ile	Arg	Asp	Cys	Leu	Ala	Val	Asp	Arg	Cys	
		290					295					300					
40	Thr	Gly	Ile	Thr	Val	Trp	Gly	Val	Arg	Asp	Ser	Asp	Ser	Trp	Arg	Ser	
	305				310						315					320	
45	Tyr	Gln	Asn	Pro	Leu	Leu	Phe	Asp	Asn	Asn	Gly	Asn	Lys	Lys	Gln	Ala	
				325					330						335		
50	Tyr	Tyr	Ala	Val	Leu	Asp	Ala	Leu	Asn	Glu	Gly	Ser	Asp	Asp	Gly	Gly	
			340					345						350			
55	Gly	Pro	Ser	Asn	Pro	Pro	Val	Ser	Pro	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
		355					360						365				
60	Gln	Ile	Arg	Gly	Val	Ala	Ser	Asn	Arg	Cys	Ile	Asp	Val	Pro	Asn	Gly	
		370				375						380					
65	Asn	Thr	Ala	Asp	Gly	Thr	Gln	Val	Gln	Leu	Tyr	Asp	Cys	His	Ser	Gly	
	385				390					395						400	
70	Ser	Asn	Gln	Gln	Trp	Thr	Tyr	Thr	Ser	Ser	Gly	Glu	Phe	Arg	Ile	Phe	
				405					410						415		
75	Gly	Asn	Lys	Cys	Leu	Asp	Ala	Gly	Gly	Ser	Ser	Asn	Gly	Ala	Val	Val	
			420					425						430			
80	Gln	Ile	Tyr	Ser	Cys	Trp	Gly	Gly	Ala	Asn	Gln	Lys	Trp	Glu	Leu	Arg	
		435					440						445				
85	Ala	Asp	Gly	Thr	Ile	Val	Gly	Val	Gln	Ser	Gly	Leu	Cys	Leu	Asp	Ala	
		450				455						460					

ES 2 301 174 T3

Val Gly Gly Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Gln Leu Tyr Ser Cys
465 470 475 480

5 Trp Gly Gly Asn Asn Gln Lys Trp Ser Tyr Asn Ala *
485 490

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 5

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
- 15 (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- 25 (A) ORGANISMO: *Actinomadura flexuosa*
- (B) CEPA: DSM43186

(ix) CARACTERÍSTICA:

- 30 (A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
- (B) LOCALIZACIÓN: 1..6
- (D) OTRA INFORMACIÓN:/marcador= AM35_N-term

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N° 5

Asp Thr Thr Ile Thr Gln
1 5

40

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 6

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 14 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- 50 (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

55

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Actinomadura flexuosa*
- 60 (B) CEPA: DSM43186

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Péptido
- (B) LOCALIZACIÓN: 1..14
- 65 (D) OTRA INFORMACIÓN:/marcador= AM50_1696_pep

ES 2 301 174 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N° 6

Ala Ala Ser Thr Leu Ala Glu Gly Ala Ala Gln His Asn Arg
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 7

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

20 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Actinomadura flexuosa*

(B) CEPA: DSM43186

(B) CEPA: DSM43186

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN:1..10

(B) LOCALIZACIÓN:1..10

(D) OTRA INFORMACIÓN:/marcador= AMSO_1697_pep

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N° 7

35 Tyr Phe Gly Val Ala Ile Ala Ala Asn Arg
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 8

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

45 (C) CADENA: sencilla

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

50 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Actinomadura flexuosa*

55 (B) CEPA: DSM43186

(B) CEPA: DSM43186

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

60 (B) LOCALIZACIÓN:1..12

(B) LOCALIZACIÓN:1..12

(D) OTRA INFORMACIÓN:/marcador= AM50_1698_pep

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N° 8

65 Leu Asn Asp Ser Val Tyr Thr Asn Ile Ala Asn Arg
 1 5 10

ES 2 301 174 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 9

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Actinomadura flexuosa*

(B) CEPA: DSM43186

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN:1..9

(D) OTRA INFORMACIÓN:/marcador= AM50_1699_pep

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 9

Xaa Thr Gly Ile Thr Val Xaa Gly Val
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 10

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Actinomadura flexuosa*

(B) CEPA: DSM43186

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN:1..11

(D) OTRA INFORMACIÓN:/marcador= AM50_1704_pep

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 10

Glu Phe Asn Ser Val Thr Ala Glu Asn Glu Met
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 11

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 301 174 T3

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Trichoderma reesei* y *Actinomadura flexuosa*

(B) CEPA: QM6a y DSM43186

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1..18

(D) OTRA INFORMACIÓN:/producto= "Proteína de fusión mananasa-xilanas" /nota= "Secuencia parcial de la fusión en pALK945. Las bases 1-5 son las bases 1342-1346 de la secuencia man1 de *T. reesei*, las bases 6-9 son sintéticas y las bases 10-18 son las bases 432-440 de la secuencia de AM35 de *A. flexuosa*."

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N° 11

TAT GGT CGC GAC ACC ACC
Tyr Gly Arg Asp Thr Thr
495

18

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 12

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N° 12

Tyr Gly Arg Asp Thr Thr
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 13

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Trichoderma reesei* y *Actinomadura flexuosa*

(B) CEPA: QM6a y DSM43186

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1..27

(D) OTRA INFORMACIÓN:/producto= "Proteína de fusión mananasa-xilanas" /nota= "Secuencia parcial de la fusión en pALK948. Las bases 1-5 son las bases 1342-1346 de la secuencia de man1 de *T. reesei*, las bases 6-18 son el engarce KEX2 sintético, las bases 19-27 son las bases 432-440 de la secuencia de AM35 de *A. flexuosa*."

ES 2 301 174 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 13

TAT GGT CGC GAC AAG CGC GAC ACC ACC
Tyr Gly Arg Asp Lys Arg Asp Thr Thr
10 15

27

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 14

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 14

Tyr Gly Arg Asp Lys Arg Asp Thr Thr
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 15

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 39 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Trichoderma reesei* y *Actinomadura flexuosa*

(B) CEPA: QM6a y DSM43186

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1..39

(D) OTRA INFORMACIÓN: /producto= "Proteína de fusión mananasa-xilanasas" /nota= "Secuencia parcial de la fusión en pALK1021. Las bases 1-18 son las bases 1342-1359 de la secuencia de man1 de *T. reesei*, y las bases 19-39 son las bases 432-52 de la secuencia de AM35 de *A. flexuosa*."

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 15

TAT GGC CAG TGT GGA GGT GAC ACC ACC ATC ACC CAG AAC
Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Asp Thr Thr Ile Thr Gln Asn
10 15 20

39

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 16

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 13 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

ES 2 301 174 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N° 16

5 Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Asp Thr Thr Ile Thr Gln Asn
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 17

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 39 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

20 (vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Trichoderma reesei* y *Actinomadura flexuosa*

(B) CEPA: QM6a y DSM43186

25 (ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN:1..39

30 (D) OTRA INFORMACIÓN:/producto= “Proteína de fusión mananasa-xilanasasa” /nota= “Secuencia parcial de la fusión en pALK1022. Las bases 1-18 son las bases 1342-1359 de la secuencia de man1 de *T. reesei*, las bases 19-30 son el engarce KEX2 sintético, las bases 31-39 son las bases 432-440 de la secuencia de AM35 de *A. flexuosa*.”

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N° 17

35

(X) DESCRIBE IN DESCENDING ORDER: 1.

TAT GGC CAG TGT GGA GGT CGC GAC AAG CGC GAC ACC ACC 39
Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Arg Asp Lys Arg Asp Thr Thr
15 20 25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 18

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 13 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N° 18

55 Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Arg Asp Lys Arg Asp Thr Thr
1 5 10