(19) OFICIUL DE STAT
PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
București

ROMANIA

(11) Nr. brevet: 116211 B1
(51) Int.Cl.[7] C 12 N 15/55;
C 12 N 9/24; A 21 D 8/04;
D 21 C 3/00; C 12 R 1:55;

(12) BREVET DE INVENȚIE

Hotarârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **96-00873**

(22) Data de depozit: **28.08.1995**

(30) Prioritate: **26.08.1994 EP 94202442.3;**

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.11.2000 BOPI nr. **11/2000**

(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. **EP 95 / 03395 28.08.1995**

(87) Publicare internațională:
Nr. **WO 96/06935 07.03.1996**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
EP 463706; WO 92/19728; Applied microbiology and biotechnology, vol. 35, nr. 6, 1991

(71) Solicitant: **GIST- BROCADES B.V., DELFT, NL;**

(73) Titular: **GIST- BROCADES B.V., DELFT, NL;**

(72) Inventatori: **VAN DER WOUW MONIQUE JOSINA ANDREA, DELFT, NL; VAN OOIJEN ALBERT JOHANNES JOSEPH, VOORBURG, NL; GIELKENS MARCUS MATHEUS CATHARINA, WAGENINGEN, NL; DE GRAAFF LEENDERT HENDRIK, OOSTERBEEK, NL; VISSER JACOB, WAGENINGEN, NL;**

(74) Mandatar: **ROMINVENT S.A. (AGENȚIE PENTRU BREVETE, DESENE, MĂRCI ȘI TRANSFER TEHNOLOGIE) BUCUREȘTI**

(54) POLIPEPTIDĂ CU ACTIVITATE DE DEGRADARE A ARABINOXILANULUI, ADN RECOMBINANT, CE O CODIFICĂ, PROCEDEU DE OBȚINERE ȘI COMPOZIȚIE ALIMENTARĂ CU ACEASTA

(57) **Rezumat:** Prezenta invenție se referă la o polipeptidă având activitate de degradare a arabinoxilanului, o secvență de ADN recombinant, care o codifică, la procedeul de obținere al polipeptidei având activitate de degradare a arabinoxilanului în celulele în care se introduce ADN-ul recombinant, care cuprinde un fragment de ADN, care codifică polipeptida, având activitate de degradare a arabinoxilanului sau o polipetidă precursor a acesteia, prin tehnici de recombinare și la o compoziție alimentară cu polipeptida care prezintă activitate de degradare a arabinoxilanului.

Revendicări: 14
Figuri: 5

RO 116211 B1

Invenția se referă la o polipeptidă având activitate de degradare a arabinoxilanului, o secvență ADN recombinant care o codifică, un procedeu de obținere a polipeptidei și o compoziție alimentară cu polipeptida care prezintă activitate de degradare a arabinoxilanului. Polipeptida prezintă activitate enzimatică de degradare a arabinoxilanului și este adecvată pentru a fi folosită în procese industriale, cum ar fi producerea pâinii, prelucrarea hârtiei și celulozei, și în prepararea hranei și alimentelor (aditivi).

Sunt cunoscute, din **EP 463706**, izolarea, caracterizarea și clonarea genei unei endo-xilanaze din *Aspergillus tubigensis*. Această enzimă nu este capabilă să atace catenele laterale ale structurii de arabinoxilan.

Este, de asemenea, cunoscută compoziția peretelui celular a plantei, iar aceasta este complexă și variabilă. Polizaharidele sunt găsite, în principal, sub formă de catene lungi de celuloză (principalul component structural al peretelui celular al plantei), hemiceluloză (cuprinzând diverse catene β-xilan) și pectină. Întâlnirea, distribuția și trăsăturile structurale ale polizaharidelor peretelui celular la plantă sunt determinate de:

(1) specia de plantă;

(2) varietate;

(3) tipul țesutului;

(4) condițiile de creștere;

(5) vârstă;

(6) prelucrarea plantei înainte de alimentare.

Există diferențe de bază între monocotiledonate (de exemplu, cereale și ierburi) și dicotiledonate (de exemplu, trifoi, rapiță de sămânță și soia) și între sămânță și părțile vegetative ale plantei (Chesson, A., 1987, "*Recent Advances in Animal Food Nutrition*"; Carre, B. și Brillouet, J.M., 1986, "*J. Science and Food Agric.*" 37: 314-351).

Monocotiledonatele sunt caracterizate prin prezența unui complex de arabinoxilan ca suport hemicelulozic principal. Structura principală a hemicelulozei în dicotiledonate este un complex de xiloglucan. Mai mult, concentrații mai ridicate de pectină sunt găsite în dicotiledonate față de monocotiledonate. Semințele sunt, în general, bogate în substanțe pectice, dar relativ sărace în material celulozic.

În peretele celular pot fi distinse trei structuri polizaharidice care interacționează mai mult sau mai puțin:

(1) lamela medie formează exteriorul peretelui celular. Ea servește, de asemenea, ca punct de atașare pentru celulele individuale una de alta în matricea țesutului plantei. Lamela medie constă din săruri de calciu ale pectinelor puternic esterificate;

(2) peretele primar este situat chiar în interiorul lamelei medii. El are o structură bine organizată de microfibrile de celuloză îmbibate într-o matrice amorfă de pectină, hemiceluloză, esteri fenolici și proteine;

(3) peretele secundar este prezent la plantele mature, în timpul creșterii plantei și fazei de îmbătrânire, se depozitează microfibrile de celuloză, hemiceluloză și lignină.

Peretele celular primar al celulelor de plante mature metabolic active (de exemplu, mezofil și epidermă) este mai susceptibil pentru hidroliză enzimatică decât peretele celular secundar, care de la acest stadiu devine puternic lignificat.

În peretele celular există un grad ridicat de interacțiune între celuloză, hemiceluloză și pectină. Degradarea enzimatică a acestei structuri polizaharidice intens reticulate nu este un proces simplu. De exemplu, pentru degradarea completă a unui arabinoxilan sunt necesare cel puțin cinci enzime diferite. Endoclivarea este efectuată prin folosirea unei endo-β(1→4)-D-xilanaze.

Exo-β(1→4)-D-xilanaza eliberează unități de xiloză la capătul nereducător al polizaharidei. Alte trei enzime (α-glucuronidaza, α-L-arabinofuranozidaza și acetil esteraza) sunt folosite pentru a ataca substituenții de pe structura xilanului. Alegerea enzimelor specifice este dependentă, desigur, de hemiceluloza specifică care trebuie degradată (McCleary, B.V. și Matheson, N.K., 1986, "*Adv. Carb. Chem. and Biochem.*" 44: 147-276).

Enzimele care atacă catenele laterale ale structurii de xilan pot fi de interes, deoarece ele schimbă caracteristicile polimerului, făcându-l mai potrivit pentru unele aplicații. Mai mult decât atât, aceste enzime pot acționa sinergic cu unele endo-xilanaze care clivează catena principală (Kormelink, 1992, "*Teză Phd*", Universitatea din Wageningen).

Este cunoscut un fragment ADN care codifică o activitate de degradare a arabinoxilanului. În cererea de brevet european **EP 463706** este descrisă izolarea, caracterizarea și clonarea genei endo-xilanaze din *Aspergillus tubigensis*; această enzimă nu este capabilă să atace catenele laterale ale structurii de arabinoxilan.

Activități enzimatice capabile să atace catene laterale sunt cunoscute, de asemenea, de la *Aspergillus niger* (Kormelink, 1991, de mai sus, capitolele 6 și 7). O enzimă denumită arabinofuranozidază A (ArafurA) este caracterizată prin capacitatea de a elibera resturi de arabinoză din structuri oligozaharidice obținute din arabinoxilani. Cu toate acestea, Arafur A nu este activă pe substraturi de greutate moleculară mare. Suplimentar, *Aspergillus niger* produce o enzimă numită Arafur B care este activă asupra oligozaharidelor, precum și pe structuri de arabinoxilan de greutate moleculară ridicată. Activitatea enzimatică a Arafur B este limitată la eliberarea resturilor de arabinoză de la terminalul substituit cu resturi unice de xiloză. Deocamdată nu se cunosc fragmentele ADN.

O activitate capabilă să elibereze resturi de arabinoză de la non-terminalul substituit cu resturi unice de xiloză, atât la oligozaharide, cât și la structuri de arabinoxilan cu greutate moleculară ridicată, s-a izolat din *Aspergillus awamori*. Această enzimă este numită arabinoxilan arabinofuranoză hidrolază (AXH). Până acum, nu sunt accesibile fragmente ADN și/sau date de secvență. Este clar că încă nu s-au detectat toate enzimele implicate în degradarea arabinoxilanului (Kormelink, 1990). De exemplu, nu s-a găsit încă nici o enzimă care să atace molecule de xiloză dublu substituite cu arabinoză. Motivul pentru aceasta este faptul că aceste enzime sunt secretate adesea în cantități mici. Clonarea moleculară și supraproducerea într-o gazdă corespunzătoare a acestor enzime, deși nu ușoară, este o cale de a se obține cantități suficiente de enzime pure, care, în schimb, permite să se cerceteze semnificația lor în diverse aplicații.

Prezenta invenție se referă la o polipeptidă având activitate de degradare a arabinoxilanului, o secvență de ADN recombinant care o codifică, la procedeul de obținere a unei polipeptide având activitate de degradare a arabinoxilanului în celule în care se introduce ADN-ul recombinant și la o compoziție alimentară cu polipeptida care prezintă activitate de degradare a arabinoxilanului.

Polipeptida cu activitate de degradare a arabinoxilanului, conform invenției, are secvența de aminoacizi dată în secvența nr. 6 sau secvența nr. 8 precum și porțiuni ale acesteia, care au activitate de degradare a arabinoxilanului.

ADN-ul recombinant, cuprinzând un fragment ADN care codifică o polipeptidă având activitate de degradare a arabinoxilanului sau o polipeptidă conform invenției, are fragmentul ADN precursor al acesteia, ales dintre:

(a) un fragment ADN care codifică o polipeptidă având secvența aminoacidă reprezentată prin aminoacizii 1-306 din Secvența nr. 5, sau o polipeptidă precursoare a polipeptidei menționate, reprezentată prin aminoacizii 27-306 din Secvența nr. 5;

(b) un fragment ADN care codifică o polipeptidă având secvența aminoacidă reprezentată prin aminoacizii 1-306 din Secvența nr. 7 sau un precursor al polipeptidei menționate, reprezentat prin aminoacizii 27-306 din Secvența nr. 7;

(c) un fragment ADN care codifică o porțiune a polipeptidelor reprezentate prin resturile de aminoacizi de la 1-306, ilustrate în Secvența nr. 5 sau 7, care au încă activitate de degradare a arabinoxilanului, sau o polipeptidă precursoare a acestora;

(d) un fragment ADN codificând o polipeptidă având activitate de degradare a arabinoxilanului și având secvența nucleotidică reprezentată prin nucleotidele 784-1779 din Secvența nr. 5 sau nucleotidele 823-1818 din Secvența nr. 7;

(e) un fragment ADN care codifică o polipeptidă având activitate de degradare a arabinoxilanului sau o parte a unei astfel de polipeptide, fragment ADN care este capabil să hibridizeze la un fragment ADN, precum cel reprezentat prin nucleotidele 784-1779 în secvența nr. 5 sau nucleotidele 823-1818 din secvența nr. 7;

iar respectivul ADN recombinant poate cuprinde, în plus, secvențe ADN regulatoare necesare pentru expresia fragementului ADN într-o celulă procariotă sau eucariotă, reprezentate prin secvențele de nucleotide 1-783 din secvența nr. 5 sau un subfragment al acestuia, capabil să regleze expresia unei secvențe AND atașată de el sau secvențele de nucleotide reprezentate prin nucleotidele 1-822 din Secvența nr.7 sau un fragment al acestuia, capabil să regleze expresia unei secvențe ADN atașată de el.

Procedeul de obținere a unei polipeptide având activitatea de degradare a arabinoxilanului, în celule în care se introduce ADN-ul recombinant care cuprinde un fragment de ADN care codifică o polipeptidă având activitatea de degradare a arabinoxilanului, sau o polipeptidă precursor al acesteia, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că el cuprinde următoarele etape:

- celulele obținute prin introducerea ADN-ului recombinant sunt selectate, apoi crescute în mediu de fermentație nutritiv convențional, conținând o sursă de carbon, o sursă de azot, o sursă de azot organic, surse nutritive anorganice și opțional un inductor (arabinoxilan);
- celulele se lasă să fermenteze pe o perioadă de 0,5-20 zile într-un procedeu discontiuu sau discontinuu cu alimentare, la temperatura de 0...45°C și un *pH* cuprins între 2 și 10;
- se îndepărtează celulele prin centrifugare sau filtrare;
- se recuperează enzima și, opțional, se purifică;

Compoziția cu polipeptida care prezintă activitate de degradare a arabinoxilanului, conform invenției, cuprinde polipeptida care prezintă activitate de degradare a arabinoxilanului, ca aditiv alimentar.

Invenția prezintă următorul avantaj:

- prezintă posibiliatea de a degrada complet arabinoxilanul, făcându-l mai potrivit pentru unele aplicații, cum ar fi, prepararea pâinii.

ADN-ul recombinant, se obține, de preferință, de la un fung filamentos, mai precis, de la o specie de *Aspergillus*. Secvențele ADN recombinant preferate în mod deosebit cuprind fragmente ADN care codifică AXDA de la *Aspergillus niger* sau *A. tubigensis*.

Conform altei realizări, ADN-ul recombinant cuprinde secvențe ADN reglatoare 5`și 3` necesare pentru expresia fragmentului ADN într-o celulă gazdă procariotă sau eucariotă în care este prezent. Secvențele ADN reglatoare sunt, de preferință, heteroloage față de secvența care codifică polipeptida numitului fragment ADN, astfel încât să sporească expresia fragmentului ADN în gazdă, față de cazul în care fragmentului ADN este legat la secvențe omoloage de ADN regulator.

Conform unei alte realizări, numitul ADN recombinant este sub forma unui vector.

Pentru realizarea invenției se asigură suplimentar o celulă gazdă eucariotă sau procariotă transformată, cuprinzând ADN-ul recombinant conform invenției, ca referință a genului *Aspergilius*, precum și un procedeu pentru obținerea unei celule gazdă capabile să sporească expresia unei enzime care degradează arabinoxilanul. Acest fapt se realizează prin tratarea unei celule gazdă în condiții de transformare cu ADN recombinant, conform invenției, și selecția, pentru o expresie sporită, a numitei enzime care degradează arabinoxilanul.

Sunt furnizate, de asemenea, metode pentru folosirea unei polipeptide pentru asigurarea degradării arabinoxilanului pentru hrană sau ca aditiv al alimentelor, în procese de prelucrare a hârtiei și celulozei, și în producerea pâinii.

Invenția furnizează molecule ADN purificate și izolate, cuprinzând secvența genelor enzimei care degradează arabinoxilanul și variantele genetice ale acesteia. Moleculele ADN pot include regiunea care codifică enzima care degradează arabinoxilanul, precum și regiunile regulatoare 5`și 3` alăturate lor. Variantele genetice includ moleculele ADN proteine arabinoxilan mutante și molecule ADN degenerate, în care activitatea dorită a enzimei exprimate de către acestea este menținută.

Invenția asigură, de asemenea, constructe ADN pentru expresia enzimelor care degradează arabinoxilanul într-o gazdă de expresie dorită. Aceste constructe de expresie includ molecule ADN hibride conținând regiuni care codifică enzime de degradare a arabinoxilanului lincate operațional la regiuni regulatoare, cum ar fi promotor, semnale de secreție și de stop originare de la organisme omoloage și heteroloage, aceste regiuni regulatoare fiind capabile să dirijeze expresia sporită a enzimei codificate de către molecula ADN care codifică enzima care degradează arabinoxilanul într-o gazdă corespunzătoare. De preferință, constructul de expresie va fi integrat în genomul gazdei de expresie alese.

Invenția asigură suplimentar vectori, de preferință plasmizi, pentru clonare și/sau transformarea gazdelor bacteriene prin intermediul introducerii în gazdă bacteriană a constructelor ADN pentru expresia enzimelor care degradează arabinoxilanul.

Suplimentar, invenția de față asigură gazde omoloage sau heteroloage, transformate cu vectori care conțin constructele ADN descrise mai sus. Gazde heteroloage pot fi alese de la bacterii, drojdii sau fungi.

În contextul invenției de față, termenul "omolog" acoperă tot ce este nativ la molecula ADN care codifică enzima care degradează arabinoxilanul de interes, inclusiv secvențele sale regulatoare. O gazdă omoloagă este definită ca specia de la care pot fi izolate astfel de molecule ADN.

Termenul "heterolog" este definit drept tot ceea ce nu este nativ pentru molecula ADN care codifică enzima care degradează arabinoxilanul, inclusiv regiunea regulatoare. O gazdă "heteroloagă" este definită ca orice specie bacteriană, alta decât cea de la care s-au izolat genele care codifică enzima care degradează arabinoxilanul.

În contextul prezentei invenții expresia "expresia sporită a enzimei de interes care degradează arabinoxilanul" este definită ca expresia enzimei de interes care degradează arabinoxilanul la niveluri peste cele care sunt observate în mod obișnuit în organismul omolog de tip sălbatic. În acest context, expresia sporită acoperă, de asemenea, formularea expresia enzimelor de interes care degradează arabinoxilanul într-un organism heterolog care, în mod normal, nu produce asemenea enzime care degradează arabinoxilanul, cu excepția introducerii moleculei ADN sau constructului de expresie care codifică enzimele de interes care degradează arabinoxilanul în gazda de expresie heteroloagă. Urmașii acestor gazde de expresie sunt desigur, de asemenea înțeleși, ca fiind cuprinși în această invenție.

Invenția include, de asemenea, secvențe ADN care hibridizează la secvențe ADN care se pot obține de la fungii descriși mai sus, dar care diferă în secvența de codoni datorită degenerării codului genetic sau variației dintre specii. Astfel, invenția include fragmente ADN care codifică enzime care degradează arabinoxilanul, care se pot obține de la alte specii decât *Aspergillus.* De obicei, procedurile pentru obținerea fragmentelor ADN similare implică cercetarea bacteriilor sau plăcilor bacteriofage, transformate cu plasmizi recombinanți care conțin fragmente ADN, de la un organism cunoscut sau așteptat să producă o enzimă care degradează arabinoxilanul conform invenției. După replicarea *in situ* a ADN-ului, ADN-ul este eliberat din celule sau plăci și imobilizat pe filtre (în general, nitrocelulozice). Apoi, filtrele pot fi cercetate pentru fragmente ADN complementare, folosind o sondă de acid nucleic marcat, bazată pe orice secvență determinată pentru genele *Aspergillus axdA.* În funcție de faptul că organismul de cercetat este înrudit mai de departe sau mai de aproape, hibridizarea și condițiile de spălare se vor adapta în scopul recuperării pozitivilor adevărați și pentru a reduce cantitatea de falși pozitivi. O procedură tipică pentru hibridizarea ADN-ului mobilizat pe filtru este descrisă în capitolul 5, tabelul 3, paginile 120 și 121 din "*Nucleic Acid hybridisation - a practical approach*, B.D. Hames & Higgins EDS., 1985, IRL Press, Oxford). Deși condițiile optime sunt de obicei determinate empiric, se pot da câteva reguli utile pentru secvențele înrudite strâns sau mai puțin strâns.

În scopul identificării fragmentelor ADN foarte strâns înrudite la sondă, hibridizarea se realizează așa cum s-a descris în tabelul 3, Hames & Higgins, (ale cărui principii de bază sunt reproduse mai jos) cu o etapă finală de spălare la stringență ridicată în 0,1 *tampon set (de 20 ori SET = 3 mM NaCl, 20 = mM EDTA, 0,4 M Tris-HCl, pH 7,8), 0,1%SDS) la 68°C.

Pentru identificarea secvențelor omoloage limitate la sondă, procedura de urmat este cea indicată în tabelul 3, Hames & Higgins, supra, dar cu temperatură redusă de hibridizare și spălare. O spălare finală de 2*SET tampon, 50°C de exemplu, va permite identificarea segmentelor care au circa 75% omologie.

Așa cum este bine cunoscut pentru specialistul având pregătire obișnuită în domeniu, relația exactă dintre omologie și condițiile de hibridizare depinde de lungimea sondei, de compoziția de bază (% de G + C) și de distribuția împerecherilor; o distribuție întâmplătoare având un efect descrescător mai puternic asupra T_m decât o imagine neîntâmplătoare sau grupată, a împerecherilor.

Condițiile de mai sus se aplică pentru sonde care au o lungime de cel puțin 300 bp, de preferință, cel puțin 500 bp, mai preferat circa 1 kbp și un conținut GC al ADN-ului de sondat de circa 50±10%. Dacă conținutul GC al unui organism dat este cunoscut, atunci condițiile se pot optimiza empiric, luând în considerare următoarea ecuație (la 1M NaCl, în domeniul 35% ≤ % (G+C) ≤ 75%): T_m=81,5°C + 0,41* (G +C). În mare, aceasta înseamnă că, dacă conținutul GC (%G + C) este cu 10% mai mare decât media, condițiile de hibridizare (stringentă) pot fi corectate prin creșterea temperaturii de hibridizare și spălare cu circa 4%C.

Pentru scopurile acestei descrieri, un fragment ADN care este numit că hibridizează la fragmentul ADN conform invenției, se difinește ca dând un semnal pozitiv pe ADN imobilizat după hibridizare cu o sondă de cel puțin 300 bp, de preferință 500 bp, mai preferat 1 kbp al oricărei secvențe prezentate în SECV.ID NR:5 sau 7, și urmând procedura de spălare din tabelul 3 din capitolul 5, Hamens & Higgins (așa cum este reprodus în esență, mai jos) la o temperatură de 50°C, 2* tampon SET (adică, 0,3 M NaCl).

Principiile procedurii descrise în tabelul 3, capitolul 5, Hamens & Higgins sunt cele care urmează:

(1) prehibridizarea filtrelor în absența sondei,

(2) hibridizarea la o temperatură între 5 + -68°C între 0,1-4* tampon SET (depinzând de stringență), 10* soluție Denhardt (100* soluție Denhardt conține 2% albumină serică bovină, 2% Ficoll 2% polivinilpirolidonă), 0,1% SDS, 0,1% pirofosfat de sodiu, 50 µg/ml ADN spermatic de somon (dintr-un stoc care se obține dizolvând 1 mg/ml ADN spermatic de somon, sonificat până la o lungime de 200 până la 500 bp, lăsat să stea în baie de apă 20 min și diluat cu apă până la o concentrație finală de 1 mg/ml); timpul de hibridizare nu este foarte critic și poate fi uneori între 1 și 24 h, de preferință, circa 16 h (o/n); sonda este de obicei marcată prin translație în fantă folosind ^{32}P ca marcaj radioactiv până la o activitate specifică de între 5 x 10^7 și 5 x 10^8 c.p.m./µg;

(3) (repetat) spălarea filtrului cu 3 x SET, 0,1% SDS, 0,1% pirofosfat de sodiu la 68°C la o temperatură între 50 și 68°C (în funcție de stringența dorită), spălare repetată scăzând în același timp concentrația SET până la 0,1%, spălare o dată timp de 20 min în 4 x SET la temperatura camerei, uscarea filtrelor pe hârtie 3MM, expunerea filtrelor la film raze X într-o casetă la -70°C, timp de între 1...96 h (depinzând de tăria semnalului) și developarea filmului).

În general, volumele amestecurilor de prehibridizare și hibridizare vor fi menținute la minimum. Toate etapele "ude" vor fi realizate în recipiente mici, sigilate într-o baie de apă preîncălzită.

Procedura de mai sus servește la definirea fragmentelor ADN numite a hibridiza conform invenției. Evident, pot fi aduse numeroase modificări procedurii pentru identificarea și izolarea fragmentelor ADN conform invenției. Se va înțelege că fragmentele ADN astfel obținute intră în termenii revendicărilor; oricând ele pot fi

detectate urmând procedura de mai sus, indiferent dacă ele au fost identificate în prezent și/sau izolate folosind această procedură.

Numeroase protocoale, care pot fi folosite adecvat pentru identificarea și izolarea fragmentelor ADN conform invenției, au fost descrise în literatură și în manuale, inclusiv cel notat Hamens & Higgins.

Procedura de mai sus este folosită pentru sonde polinucleotidice. Când urmează să fie folosite sonde oligonucleotidice, relația dintre T_d, temperatura la care un hibrid de împerechere perfectă este jumătate disociat, se estimează prin relația: T_d=4°C per GC bp + 2°C per AT bp. Pe baza protocoalelor existente și folosind această regulă, se pot desemna, de asemenea, sonde oligonucleotidice pentru izolarea eficientă de fragmente ADN care codifică enzimele care degradează arabinoxilanul, conform invenției, de la organisme înrudite și mai departe. Procedura folosind oligonucleotide este utilă în mod deosebit dacă o enzimă s-a purificat de la o sursă diferită și s-a determinat parțial secvența de aminoacizi. Folosind această secvență, se poate face un set de sonde degenerate pentru cercetarea unei bănci ADN sau Southern bloot, în esență, așa cum s-a descris mai sus.

Candidații buni pentru căutare sunt alți fungi filamentoși precum *Trichoderma, Penicillum, Dichotomitus squalus, Desporotrichum dimorphosporum*, și bacterii precum specii de *Bacillus* și alte asemenea.

Dacă rezultatele cercetării inițiale în clone par să conțină fragmente hibridizate, astfel de fragmente pot fi izolate și, dacă se dorește, secvențate, pentru determinarea similarităților secvențelor.

O dată ce s-a identificat o enzimă de interes care degradează arabinoxilanul, secvența ADN care codifică o astfel de enzimă se poate obține din fungul filamentos care o produce în mod natural prin cultivarea fungului într-un mediu care conține arabinoxilan, izolarea enzimei dorite care degradează arabinoxilan, folosind metode cunoscute asemenea celor evidențiate în exemplul 1, și determinarea cel puțin a unei porțiuni a secvenței aminoacide a proteinei purificate.

Sonde ADN pot fi obținute după aceea, prin desemnarea secvențelor oligonucleotidice bazate pe secvența aminoacidă dedusă parțial. Secvențele aminoacide se pot determina de la N-terminal al proteinei complete și/sau de la N-terminal al fragmentelor peptidice interne, obținute prin digestia proteolitică sau chimică a proteinei complete. O dată obținute, sonda(le) ADN se folosește (folosesc) apoi pentru cercetarea unei bănci genomice sau cADN.

O bancă genomică se poate prepara digerând parțial ADN cromozomial fungic cu o enzimă de restricție care recunoaște o secvență de 4 nucleotide succesive, de exemplu Sau3A, și clonarea fragmentului rezultat într-un plasmid adecvat sau vectori *fag lambda*, de exemplu, *lambda GEM-11.*

Alternativ, o bancă cADN se poate prepara prin clonarea ADN sintetizat de la mARN izolat din celule fungice induse pentru sinteza unei enzime care degradează arabinoxilanul într-un vector fag, corespunzător, de exemplu, *lambda gt 10.*

În continuare, după etalarea unei cantități suficiente de colonii sau plăci, banca genomică sau cADN poate fi cercetată cu o sondă ADN adecvată.

Dacă această metodă nu reușește, banca genomică sau cADN poate fi cercetată diferențial cu sonde cADN obținute din mARN de la celule neinduse și induse. Se prepară mARN indus din celule cunoscute, pe medii care conțin arabinoxilan ca

sursă de carbon, în timp ce mARN neindus trebuie să fie izolat de la celule crescute pe o sursă de carbon alta decât arabinoxilan, de exemplu, glucoză. Dintre clonele care hibridizează numai cu sonda cADN indusă, poate fi recuperată o clonă care conține gene care codifică enzima dorită care degradează arabinoxilan. Alternativ, o genă de enzimă care degradează arabinoxilan se poate identifica prin hibridizare încrucișată cu o secvență înrudită.

De preferință, sondele oligonucleotidice sunt obținute de la secvența aminoacidă N-terminală (vezi, exemple) a unei enzime care degradează arabinoxilan având o greutate moleculară aparentă de 32 kDa purificată dintr-un filament de cultură *Aspergillus niger* și/sau de la secvența aminoacidă a unui fragment peptidic intern (vezi exemple) obținut prin digestia enzimei CNBr.

Amestecurile oligonucleotidice dezvoltate astfel pot fi folosite pentru a hibridiza cu ambele bănci, genomică și cADN. Alternativ, așa cum s-a ilustrat aici, enzima purificată AXDA se folosește pentru a provoca anticorpi. Anticorpii se utilizează în imunocercetarea băncilor de expresie. Astfel, se identifică expresia clonelor AXDA. Ar fi de remarcat că proteina se izolează din *A. Niger,* varietatea *tubigensis* și cADN se izolează din *A.niger N400* ilustrând că activitatea AXDA este conținută în diverse *Aspergillus.*

O dată cu apariția a noi tehnici de amplificare ADN cum ar fi direct sau invers, de asemenea, este posibil să se cloneze fragmente ADN *in vitro*, o dată ce sunt cunoscute regiunile de decodificare ale secvențelor terminale.

Accesibilitatea unei secvențe ADN care codifică o enzimă care degradează arabinoxilanul face posibilă construcția moleculelor de enzime mutante prin mutageneză directă în sit. Dacă structura terțiară a enzimei care degradează arabinoxilanul este cunoscută și sunt localizate domeniile sale catalitice și de legare la substrat, pot fi aleși pentru mutageneză aminoacizii (de exemplu, cu ajutorul modelării pe computer) care afectează cel mai puțin funcțiile catalitice și/sau legare la substrat. Dacă structura terțiară a proteinei nu este accesibilă, pot fi generați mutanți oarecare fie împreună cu întreaga secvență de codificare, fie cu structura terțiară a proteinei care poate fi propusă prin comparație cu enzime similare cunoscute, izolate de la alt microorganism.

Pentru a facilita inserția fragmentului ADN conținând secvența care codifică AXDA în constructe de expresie cuprinzând una sau mai multe regiuni regulatoare heterogene, se poate folosi reacția polimerazică de catenă (PCR) (PCR Technology; *Principles and Applicatins for DNA Amplification*, (1989)H.A. Ehrlich, ed., Stockton Press, New York) pentru introducerea situsurilor enzimatice de restricție adecvate în capetele 5′ și 3` ale secvenței care codifică AXDA. Alegerea situsurilor de restricție depinde de secvența ADN a vectorului de expresie, adică de prezența altor situri de restricție în molecula ADN.

Pentru obținerea expresiei mărite a proteinelor AXDA în specii productive inițial (omoloage) sau alternativ, într-o tulpină fungică heteroloagă, regiunile ADN care codifică AXDA, inclusiv propria lor regiune de control, se induc într-o gazdă de expresie selectată pentru a crește numărul de copii ale genei și, prin urmare, expresia proteinei.

Dacă este preferată, o gazdă de expresie heteroloagă, și se alege o tulpină de drojdie sau o tulpină bacteriană, se folosește o moleculă ADN neîntreruptă pentru

construcția unui vector de expresie heterolog în scopul de a evita posibilitatea ca semnalele de conexiune directă, situate pe fragmentul genomic, să nu fie recunoscute de către gazda heteroloagă. Această moleculă neîntreruptă de ADN poate fi obținută de la o bancă cADN construită de la mARN izolat din celule induse pentru sinteza AXDA. Această bancă poate fi cercetată cu o sondă oligonucleotidică sau sondă cADN obținută cum s-a descris mai sus. Alternativ, o moleculă de ADN neîntrerupt poate fi obținută prin aplicarea unei reacții polimerazice de catenă, folosind oligonucleotide 5` și 3` corespunzătoare, pe prima bandă cADN sintetizată de la ARN-ul celulelor induse arabinoxilan.

Expresia sporită a AXDA de interes poate fi obținută, de asemenea, prin selectarea regiunilor regulatoare heteroloage, de exemplu, promotor, lider de secreție și regiuni terminatoare care servesc pentru creșterea expresiei și, dacă se dorește, a nivelurilor secreției proteinei de interes din gazda de expresie aleasă, și/sau a asigura controlul inducător al expresiei AXDA de interes.

Exceptând promotorul nativ al AXDA de interes se pot folosi alți promotori pentru dirijarea expresiei sale. Promotorul se poate selecta pentru eficiența sa în dirijarea expresiei AXDA de interes în gazda de expresie dorită.

Într-o altă realizare, se poate selecta un promotor constructiv pentru a dirija expresia AXDA dorită, relativ lipsită de alte enzime. Un astfel de construct de expresie este mai mult decât avantajos, deoarece el ocolește necesitatea de a cultiva gazdele de expresie pe un mediu conținând arabinoxilan ca substrat de inducere.

Exemple de promotori constructivi puternici și/sau inductori care sunt preferați pentru utilizare în gazde de expresie fungice sunt promotorii ATP/sintetază, subunitate (nouă) 9 (olic), triozofosfatizomerază (tpi) alcool dezidrogenază (adhA), α-amilază (amy), glucoamilază (gam), acetamidă (amdS) și gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenază (gpd).

Exemplele de promotori puternici de drojdie sunt: alcooldehidrogenaza, lactoza, 3-fosfogliceratkinaza și triofosfatizomeraza.

Exemplele de promotori bacterieni puternici sunt promotorii α-amilază și Spo2,precum și promotori de la genele proteazei extracelulare.

Pentru îmbunătățirea reglării de inducere a constructului de expresie pot fi, de asemenea, folosiți avantajos promotorii hibrizi.

Adesea, este de dorit ca AXDA de interes să fie secretată din gazda de expresie în mediu de cultură.

Conform prezentei invenții, pentru a exprima secreția AXDA, se poate folosi secvența lider de secreție a AXDA de interes nativ.

Totuși, o creștere în expresia enzimei rezultă uneori în producerea proteinei la un nivel peste cel la care gazda de expresie este capabilă să o prelucreze și să o secrete, creând o strangulare, astfel că produsul proteic se acumulează în celulă. Pentru conformitate, prezenta invenție furnizează, de asemenea, secvențe lider heteroloage, pentru a asigura cea mai eficientă secreție a enzimei din gazda de expresie aleasă.

Conform prezentei invenții, liderul de secreție se poate alege pe baza gazdei de expresie dorită. Un lider de secreție heterolog poate fi ales astfel, încât să fie omolog altor regiuni regulatoare ale constructului de expresie. De exemplu, liderul proteinei glucoamilază puternic secretate se poate folosi în combinație cu, chiar,

promotorul glucoamilază, precum și în combinație cu alți promotori. De asemenea, se pot folosi în mod avantajos secvențe semnal hibride în contextul invenției de față.

Exemplele de secvențe lider de secreție, heteroloage, preferate, sunt cele originare de la gena glucoamilază (fungi) gena α-factor (drojdii) sau gena α-amilaza (*Bacillus*).

În general, terminatorii nu se consideră a fi elemente critice pentru expresia sporită a genelor. Dacă se dorește, se poate selecta un terminator, un promotor de la aceleași gene sau alternativ, poate fi folosit terminatorul omolog.

În plus, la fragmentul genomic menționat mai sus, ADN-ul de transformare poate conține un marker de selecție, pentru a putea diferenția celulele care au încorporat gena dorită din masa de celule netransformate. Acest marker de selecție, asigurat de secvențe regulatoare 5′ și 3′ corespunzătoare poate să fie situat pe aceeași moleculă ADN care conține gena dorită sau poate fi prezent pe o moleculă separată. În ultimul caz, trebuie să se realizeze o co-transformare. Raportul vector de expresie/vector de selecție trebuie să fie ajustat într-un astfel de mod, încât un procent ridicat al transformaților selectați să aibă, de asemenea, încorporat vectorul care conține constructul de expresie al AXDA de interes. Cele mai potrivite sisteme de selecție pentru microorganismele industriale sunt cele formate de către grupul de marker de selecție care nu necesită o mutație în organismul gazdă. Exemple de markeri de selecție fungici sunt genele pentru acetamidaza (amdS), ATP-sintetaza, subunitatea 9 (oliC) și de rezistență binomil (benA). Markeri de selecție non-fungici exemplificatori sunt gena bacteriană de rezistență G418 (aceasta se poate folosi, de asemenea, la drojdii, dar nu și la fungi), gena de rezistență la ampicilină (*E, Coli*) și gena de rezistență la neomicină (*Bacillus*).

O dată ce constructul de expresie dorit a fost asamblat, el se trasformă într-o gazdă de clonare corespunzătoare cum ar fi *E. coli*, pentru a propaga constructul. După aceea, constructul de expresie se introduce într-o gazdă de expresie adecvată, în care constructul de expresie este, de preferință, integrat în genom. Anumite gazde ca specii de *Bacillus* pot fi folosite atât ca gazde de expresie, cât și ca gazde de clonare, evitând astfel o etapă în plus de transformare.

Conform prezentei invenții, se pot folosi ca gazde pentru producerea AXDA de interes o varietate de organisme.

Într-un mod preferat de realizare, se poate folosi o gazdă de expresie omoloagă. Aceasta implică introducerea constructului de expresie înapoi la tulpina de la care s-a izolat secvența ADN care codifică AXDA fie într-o genă cu număr crescut de copii, fie sub controlul regiunilor de reglare heteroloagă, așa cum s-a descris mai sus, sau în ambele.

În alt mod de realizare preferat, o AXDA de interes poate fi produsă și prin introducerea expresiei constructului ADN care codifică gena de interes care degradează arabinoxilanul sub controlul regiunilor regulatoare corespunzătoare, în gazde heteroloage precum bacterii, drojdii sau fungi. Pentru acest scop, secvențele ADN care codifică AXDA de interes se exprimă, de preferință, sub controlul promotorului și secvențelor reglatoare originare de la gazda heteroloagă. În plus, poate fi necesar să se înlocuiască secvența lider de secreție nativă cu o secvență lider omoloagă pentru expresia gazdei, în scopul atingerii celei mai eficiente expresii și secreții a produsului.

Factori precum mărimea (greutate moleculară), necesitatea pentru glicozilare proprie sau dorința unei secreții extracelulare a AXDA de interes, joacă un rol important în alegerea gazdei de expresie.

Bacteria *gram*-negativă este folosită pe larg ca o gazdă pentru expresia genei heteroloage. Totuși, cantități mari de proteină heteroloagă tind să se acumuleze în interiorul celulei. Purificarea ulterioară a proteinei dorite din masa de proteine intracelulare *E. coli* poate fi uneori dificilă.

Spre deosebire de *E. coli*, bacteriile din genul *Bacillus* sunt foarte potrivite ca gazde heteroloage, datorită capacității lor de a secreta proteine în mediul de cultură.

În funcție de natura moleculei ADN care codifică AXDA și/sau dorința de a prelucra ulterior proteina exprimată, pot fi preferate gazde eucariote ca drojdii sau fungi. În general, sunt preferate celulele de drojdie față de celulele fungice, deoarece ele sunt mai ușor de manipulat. Cu toate acestea, unele proteine sunt fie puțin secretate din celulele de drojdie, fie, în unele cazuri, nu sunt prelucrate corespunzător (de exemplu, hiperglicozilarea de la drojdie). În aceste situații, va fi ales un organism gazdă fungic.

De asemenea, poate fi aleasă o gazdă heteroloagă pentru a exprima AXDA de interes, lipsită, în principal, de alte enzime care degradează polizaharide, alegând o gazdă care nu produce, în mod normal, asemenea enzime, cum ar fi *Kluyveromyces lactis*.

Exemple de gazdă de expresie preferată în întinderea invenției de față sunt fungi precum specii de *Aspergillus* (descrise în **EP 18443** și **EP 284603**) și specii *Trichoderma*, bacterii precum specii de *Bacillus* (descrise în **EP 134048**) și drojdii ca specii *Klyveromyces* (descrise în **EP 96430** și **EP 301670**) și specii de *Saccharomyces*.

Gazde de expresie preferate în mod deosebit pot fi alese dintre *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger* var. Awamori, *Aspergillus aculeatis*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Klyveromyces lactis* și *Saccharomyces cerevisiae*.

Expresia enzimei AXDA de interes este efectuată prin cultivarea gazdelor de expresie care s-au transformat cu constructul de expresie adecvat, într-un mediu nutritiv de fermentație convențional.

Mediul de fermentație constă dintr-un mediu ce cultură obișnuit, care conține o sursă de carbon (de exemplu, glucoză, maltoză, melasă etc.), o sursă de azot (de exemplu, sulfat de amoniu, azotat de amoniu, clorură de amoniu etc.), o sursă de azot organic (de exemplu, extract de drojdie, extract de malț, peptonă etc.) și surse nutritive anorganice (de exemplu, fosfat, magneziu, potasiu, zinc, fier etc.). Opțional, se poate include un inductor (arabinoxilan).

Selectarea mediului corespunzător se poate baza pe alegerea gazdelor de expresie și/sau pe baza cerințelor regulatoare ale constructului de expresie. Astfel de medii sunt binecunoscute pentru cei cu pregătire în domeniu. Mediul poate conține, dacă se dorește, componente suplimentare care să favorizeze gazdele de expresie transformate față de alte microorganisme potențial contaminante.

Fermentația se realizează pe o perioadă de 0,5-20 de zile într-o baie, sau printr-un procedeu baie, alimentată la o temperatură în domeniul cuprins între 0 și 45°C și la un *p*H între 2 și 10.

Condițiile de fermentare preferate sunt: o temperatură în domeniul dintre 20...37°C și un *p*H între 3...9. Condițiile corespunzătoare se aleg pe baza gazdei de expresie.

După fermentație, celulele sunt îndepărtate din bulionul de fermentație prin intermediul centrifugării sau filtrării. După îndepărtarea celulelor, enzima poate fi recuperată și, dacă se dorește, purificată și izolată prin mijloace convenționale.

Produsul este formulat stabil, fie în formă lichidă, fie în formă uscată. Pentru anumite aplicații, poate fi preferată imobilizarea enzimei pe o matrice solidă.

Enzimele produse prin mijloacele prezentei invenții pot fi aplicate fie singure, fie împreună cu alte enzime selectate într-o diversitate de procese care necesită acțiunea unei enzime care degradează arabinoxilan.

Enzima care degradează arabinoxilan, a prezentei invenții, se folosește în tratamentul sau prepararea alimentelor (de exemplu, pâine), hrană și băuturi (de exemplu, bere și sucuri din fructe).

Enzima care degradează arabinoxilan se folosește, de asemenea, în prepararea și tratamentul hârtiei și celulozei, în special în combinație cu endoxilanazele.

Așa cum s-a ilustrat în prezenta invenție, enzima care degradează arabinoxilan se adaugă la hrana animalelor, care este bogată în arabinoxilan. Când s-a adăugat la hrană (inclusiv furaje însilozate) pentru animale monogastrice (de exemplu, pui sau porci), care conține cereale, cum ar fi, orz, grâu, porumb, orez sau ovăz sau subproduse de cereale precum tărâțe de grâu și porumb, enzima îmbunătățește semnificativ degradarea pereților celulari de la plante, ceea ce conduce la utilizarea mai bună a nutrienților plantei de către animal. Ca o consecință, sunt îmbunătățite rata de creștere și/sau conversia hranei. Mai mult, enzimele care degradează arabinoxilan se pot folosi pentru reducerea viscozității alimentelor care conțin arabinoxilan.

O enzimă care degradează arabinoxilan poate fi adăugată la alimente înainte sau la însilozare, în funcție de preferința pentru regimuri alimentare preumede sau umede. Mai avantajos, AXDA produsă prin intermediul prezentei invenții continuă să hidrolizeze *in vivo* arabinoxilanul din alimente.

Enzimele care degradează arabinoxilan sunt utile, de asemenea, în prepararea pâinii, așa cum s-a ilustrat în exemplul 8.

În continuare se prezintă 8 exemple de realizare a invenției, în legătură și cu fig. 1...5, care reprezintă:

- fig. 1, profilul eluției activității care degradează arabinoxilanul (OD280) pe HPLC.
- fig. 2, diagrama care prezintă AXDA asupra solidelor insolubile în apă (WIS), fracție a porumbului ca o funcție a *p*H-ului.
- fig. 3, procentul digestiei *in vitro* al WIS de porumb ca o funcție a cantității de enzimă AXDA brută.
- fig. 4, harta de restricție a siturilor din *pIM3001.*
- fig. 5, harta de restricție a siturilor din *pIM3002.*

În exemplele de realizare se folosesc următoarele tulpini și vectori:

Tulpini

E. coli BB4 (Silvay, T.J., Berman, M.L., Enquist, L.W., 1984, "*Experiments with gene fusions*", Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p.xi-xii):

e14 (mcrA) hsdR514, supE44, supF58, LacY1, sau Δ(lac1ZY)6, galK2, gal)22, metB1, trpR55, Δ(argF-lac)U169 [F', proAB, lacI^{q}ZΔM15, Tn10, (tet^r)]

E. coli DH5 α (Hanahan,D., 1983, "J.Mol.Biol." 166: 557):

supE44, ΔlacU169, (φ80lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1.

E. coli LE 392 (Murray,N., 1977, "Mol.Gen.Genet." 150: 53-58):

e14 (mcrA) hsdR514, supE44, supF59, lacY1, sau Δ(lac1ZY)6, galK2, galT22, metB1, trpR55

E. coli XL1-Blue MRF' (Jerseth,B. et al., 1992, "Strategies" 5: 81-83)

Δ(mcrA)13, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, GyrA96, relA1, lac, [F', proAB, lacI^{q}ZM15, ΔTn10, (tet^r)]

Aspergillus niger n400 (CBS 120,49)

Aspergillus niger N400 (cspA1) Goosen et al., 1987

Aspergillus niger NW219 (leuA1, nicA1, pyrA6)

Vectori

pBluescript SK +/- (Short, J.M. et al., 1988, "*Nucleic Acids Res.*" 16: 7583-7600)

pUC19 (Yanish-Peron,C. et al., 1985, "*Gene*" 33: 103-119)

Următoarele soluții s-au preparat conform cu Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989), "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", ed. a 2-a, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY:

Tampoane: TE, 50*TAE, 20*SSC; hibridizare, 100*Dendardt, SM, încărcare ADN

Medii: NZYCM, LB și mediu minimal.

Soluția Visniac s-a preparat conform lui Visniac, W., Santer, M., (1957), *"Bact.Rev."* 21: 195-213.

Exemplul 1. *Izolarea enzimei*

Exemplul 1.1: *Purificarea și caracterizarea activității A care degradează arabinoxilan (AXDA) A. niger var. tubigensis.*

A. niger var. *tubigensis DS 16183* se crește, așa cum s-a descris în **EP 0463706**, fără extract de drojdie și 2% fracțiune arabinoxilan de grâu brut în loc de xilan de ovăz. Celulele se îndepărtează prin filtrare și supernatantul se usucă prin ultrafiltrare.

Pentru purificarea AXDA se diluează 5 g de preparat enzimatic brut în 100 ml 10 mM Tris/HCl *p*H 8,0. Soluția de enzimă se filtrează (Seith/supro nr. 250 și Seith/supro EKS) și se diluează până la o concentrație proteică finală (analiză proteică Biorad) de 5,2 g/l. Enzima brută se fracționează prin HPLC (Waters Preparative 650 Advanced Protein Purification System) pe o coloană de schimb anionic DEA TSK 650 (M) (600 ml) (rată 25 ml/min). Coloana se echilibrează cu 25 mM Tris/HCl (*p*H 8,0). Proba (3 g de proteină) se aplică la o coloană și se eluează cu un gradient de tampon de echilibrare conținând 100 mM NaCl. Enzima AXDA se eluează la o concentrație NaCl de 53 mM, așa cum s-a prezentat în fig. 1.

Exemplul 1.2. *pH optim*

Pentru determinarea *p*H-ului optim al preparatului enzimatic brut AXDA, se folosește ca substrat fracțiunea polimerică de solide insolubile în apă de la porumb (WIS). Se adaugă 1,6 mg de preparat enzimatic brut la 0,5 g WIS și se diluează până la 5 ml cu tampon (100 mM NaAc) de *p*H variind de la 3,40 până la 7,65. Probele se incubează 60 min la 39°C și se centrifughează timp de 15 min (2800 g). Se măsoară zaharurile reducătoare din supernatant folosind reactiv Sumner.

Prepararea reactivului Sumner: se adaugă 10 g fenol la 22 ml de NaOH 10%, apoi volumul se aduce la 100 ml cu apă demineralizată. Se adaugă 10 g de $NaHSO_3$. La 70 ml din această soluție se adaugă 300 ml NaOH 4,5% urmat de 255 g tartrat K/Na și 800 ml acid 3,5-dinitrosalicilic 1%. Amestecul se agită apoi la temperatura camerei până când se dizolvă substanțele.

Se adaugă 0,5 ml de reactiv Sumner la 200 µl probă și se fierbe 10 min. După răcire, se adaugă 5 ml apă demineralizată. Se măsoară extincția la 515 nm. Conținutul de zahăr reducător al probelor se calculează folosind o curbă de calibrare a xilozei.

*p*H-ul optim pentru enzimă este 5,0, așa cum se arată în fig. 2.

Exemplul 1.3. *Compoziția aminoacidă*

Din fracțiunile AXDA ale coloanei DEAE se măsoară compoziția aminoacidă pe o coloană PICO-TAG 150 MM (detecție la 254 nm). Se găsește următoarea compoziție:

Compoziția aminoacidă a AXDA

Aminoacid	mM	mol calculat (%)
ASP	1,11	13,43
GLU	0,66	8,13
SER	1,00	12,13
GLN	0,00	0,00
GLY	0,84	10,25
HIS	0,12	1,30
ARG/ASN	0,18	2,12
THR	0,71	8,48
ALA	0,74	8,83
PRO	0,34	4,00
TYR	0,46	5,54
VAL	0,43	5,06
MET	0,11	1,30
ILE	0,29	3,42
LEU	0,52	6,12
*p*HE	0,43	5,18
LYS	0,38	4,59

Pompă HPLC: CM 4000; detecție M440, 254 nm; injectare 4 µl, Gilson 232; coloană PICO-TAG 150 MM; sistem de date Maxima.

Exemplul 1.4. *Caracterizarea biochimică (IEP și greutate moleculară)*

Se determină IEP al AXDA pe un minigel Pharmacia *pH* 3-9. Proteina se colorează cu o soluție de colorare argint Pharmacia. Se estimează IEP al enzimei AXDA ca fiind 3,6.

Greutatea moleculară a AXDA se determină pe un minigradient gel SDS Pharmacia (10...15%) și se detectează proteinele prin colorație argint (Pharmacia). Greutatea moleculară a AXDA se estimează a fi 32 kDa.

Exemplul 1.5. *Secvențarea proteinei activității A care degradează arabinoxilan (AXDA) a A. Niger var. tubigensis*

Exemplul 1.5.1. *Secvențarea aminoacizilor de la capătul N-terminal a activității A care degradează arabinoxilan din A. Niger var. tubigensis*

Se supune aproximativ 1 nmol (circa 30 µg) AXDA la electroforeză pe un gel 15% poliacrilamidă SDS urmat de electrobloting pe membrană Immobilon-P (Millipore), conform metodei descrise de către Matsudaira, P. (1987), "J.*Biol.Chem.*", 262: 10035-10038. Fragmentul de membrană care conține banda principală având o greutate moleculară aparentă (SDS-PAGE) de 32 kDa se supune la analiza secvenței prin secvențare în fază gazoasă (Amons, R., 1987, "*FEBS lett.*",212: 68-72) (SOM facility, Leiden). Se determină următoarea secvență:

Lys-?-Ala-Leu-Pro-Ser-Ser-Tyr (Secvența nr. 1)

Exemplul 1.5.2. *Determinarea secvenței aminoacizilor unei peptide CNBr a activității A care degradează arabinoxilan (AXDA)*

Se supun la clivaj chimic prin CNBr aproximativ 2 nmoli AXDA. Aproximativ 2 nmol (circa 60 µg) AXDA se usucă prin înghețare și se resuspendă în 60 µl acid formic 70% conținând 125 µg CNBr (2,5 mg/ml). Acest amestec de reacție se incubează la întuneric la temperatura camerei 48 h. Lichidul se evaporă într-un Speedvac, se spală cu apă bidistilată sterilă și se evaporă din nou. Această etapă de spălare se repetă de două ori. Amestecul de reacție se supune apoi la electroforeză pe un gel SDS-poliacrilamidă 15% urmat de electrobloting pe o membrană Immobilon-P (Millipore) conform metodei descrise de către Matsudaira, P. (1987), "*J.Biol.Chem.*", 262: 10035-10038. Fragmentul de membrană care conține banda principală având o greutate moleculară aparentă (SDS-page) de 9 kDa se supune analizei secvenței prin secvențare în fază gazoasă (Amons, R., 1987, "*FEBS lett.*",212: 68-72) (SON facility, Leiden). Se determină următoarea secvență:

Peptidă CNBr:

Ile-Val-Glu-Ala-Ile-Gly-Ser-Thr-Gly-His-Arg-Tyr-*p*He-(Arg/Asn)-(Ser)-(*p*He)-(Thr) (Secvența nr. 2)

Aminoacizii neclari sunt dați între paranteze.

Exemplul 2. *Profilul enzimatic al AXDA*

Activitatea α-arabinofuranozidazică se măsoară pe un substrat *para*-nitrofenil arabinofuranozidă (Sigma). Se adaugă la 1 ml substrat 300 µl soluție de enzimă. După 15 min de incubare, la 30°C, reacția se oprește cu 5 ml Na_2CO_3 (5M). Se măsoară extincția la 402 nm. Se calculează activitatea α-arabinofuranozidazică (volum* extincție)/(E*timp).

Preparatul enzimatic pur conține o activitate α-arabinofuranozidazică de 0,30 pNPAF U/mg. Se testează pentru activitate fracțiunile de la coloana DEAE. Depozitul arabinofuranozidază activă conține 3,0 pNPAF U/mg (vezi fig.1). Nu se găsesc alte fracțiuni cu activitate α-furanozidazică. Depozitul α-arabinofuranozidază activă se testează mai târziu pe o fracțiune de polimer a porumbului insolubil în apă și pe acest substrat nu se măsoară nici o activitate.

Aceasta arată că AXDA nu are activitate α-arabinofuranozidazică pe substrat paranitrofenil.

Într-o încercare ulterioară de a identifica activitatea AXDA, filtratele unei culturi *Aspergillus niger* transformate cu gena axdA *Aspergillus tubigensis* se cercetează pentru activitate pe un substrat constând din arabinoxilan de grâu. Gena tubigensis se plasează sub controlul promotorului piruvatchinază (un glicolitic) și condițiile de creștere se aleg astfel, încât să favorizeze expresia transgenei, evitând expresia enzimelor endogene care degradează arabinoza.

Pentru conformitate, se determină că AXDA are activitate de eliberare a arabinozei pe substrate arabinoxilanice de greutate moleculară mare. Conținutul de proteină se determină folosind metoda Sedmak. Activitatea AXDA se determină adăugând 100 µl de diferite diluții (în tampon 10 mM acetat de sodiu *p*H 5,0) a filtratelor culturii la 150 µl acetat de sodiu 50 mM (*p*H 5,0) și 250 µl arabinoxilan de grâu 0,4% (Megazyme) și incubare la 40°C timp de 1 h. Reacția se oprește prin încălzirea amestecurilor pe durata a 10 min la 100°C. Produsele degradării arabinoxilanului se urmăresc folosind HPAEC (cromatografie de schimb anionic de înaltă performanță), folosind ca probe incubările inactivate termic.
Rezultatele sunt cele care urmează:

Activitatea AXDA a Aspergillus tubigensis pe arabinoxilan de grâu.

Tabelul 1

Probă	Conținut proteină (mg/100 mg)	Unități AXDA/ml	Activitate specifică
A 3003 12 (conc.)	0,057	22,4	191,5
B 3003 15 (conc.)	0,064	31,48	233,2
C 3003 12 (perm.)	*	0,028	–
D 3003 15 (perm.)	*	0,032	–

O unitate de activitate arabinofuranohidrolază se definește ca fiind cantitatea de enzimă capabilă să elibereze 1 µmol de arabinoză din arabinoxilan per minut.

Se ajunge la concluzia că enzima AXDA de *Aspergillus tubigensis* are activitate arabinofuranohidrolazică (AXH).

Activitatea arabinază se măsoară cu o trusă de testare arabinază de la Megazyme și se execută urmând instrucțiunile. În experiment depozitul AXDA de la coloana DEAE nu a prezentat activitate asupra arabinanului liniar.

Aceasta arată că AXDA nu este o arabinază.

Activitatea endoxilanază se măsoară pe xilan de ovăz. Se fierb 10 ml de suspensie xilan 5% (100 mM NaAc *p*H 3,5) timp de 10 min. După coborârea temperaturii, suspensia se incubează la 39°C timp de 10 min. Reacția se începe prin adăugarea a 0,5 ml soluție de enzimă. După câteva perioade de incubare (5, 10, 15, 20 și 25 min) se adaugă 1,5 ml probă de la incubarea la 39°C la 1,5 ml apă demineralizată și se fierb 10 min. Probele se centrifughează 15 min. (2800 g). Se detectează zaharuri reducătoare pe supernatant cu reactivul Sumner (vezi exemplul 1.2).

În depozitul fracțiunii AXDA se găsește o activitate endoxilanază de 339,0 U/mg. Endoxilanază și AXDA se testează mai târziu într-un sistem de digestie *in vitro* (vezi exemplul 6).

De aici se ajunge la concluzia că activitatea endoxilanază din depozitul fracțiunii ADXA este o activitate asociată cu o activitate polipeptidică diferită. O indicație suplimentară este găsită de către Kormelink (1992, *p*HD. *Thesis*, Chapter 6, p.107, ultimele două paragrafe și p. 108) și anume aceea conform căreia o polipeptidă având activitate endoxilanază co-eluează cu o enzimă similară AXDA. Se ajunge la concluzia că AXDA în sine nu are activitate endoxilanază.

Exemplul 3. *Construcția unei bănci de expresie cADN*

Exemplul 3.1. *Inducerea și izolarea mARN*

Se crește o cultură *A. niger* N400 timp de 69 h și, respectiv, 81 h, așa cum s-a descris în **EP 0463706** fără extract de drojdie și 2% fracțiune arabinoxilan de grâu brut în loc de xilan de ovăz, după care miceliul se recoltează prin filtrare și apoi se spală cu soluție salină sterilă. Miceliul este, în continuare, înghețat în azot lichid, după care se transformă în pudră folosind un Microdismembrator (Braun). Se izolează ARN total din pudra de miceliu, în conformitate cu protocolul tiocianat de guanidină / CsCl descris în Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., (1989), în "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", ed. a 2-a, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, cu excepția faptului că ARN-ul se centrifughează de două ori folosind un gradient CsCl. Se izolează poliA$^+$ mARN din 5 mg de ARN total prin cromatografie oligo(dT)-celuloză (Aviv și Leder, 1972, Sambroock et al., 1989) cu următoarele modificări: se omite SDS din toate soluțiile și tamponul de încărcare se suplimentează cu 9% dimetilsulfoxid (v/v).

Exemplul 3.2. *Construcția băncii cADN*

Se sintetizează cADN din 7 µg poliA$^+$mARN și se leagă în bacteriofagul Lambda λ Uni-ZAP XR folosind trusa de sinteză ZAP™-cDNA (Stratagene) urmând instrucțiunile fabricantului. După ligarea cADN-ului în vectorul Uni-ZAP XR, fagul ADN se împachetează folosind extracte Packagene™ (Promega) conform instrucțiunilor fabricanților. Ligarea a 120 ng cADN în 1,2 µg vector ramificat și împachetarea ulterioară a amestecului de reacție are ca urmare o primă bancă constând din 3,5 x 10^4 fagi recombinanți. Această bancă inițială se amplifică folosind *E. coli* XL1-Blue MRF', se titrează și se depozitează la 4°C.

Exemplul 4. *Cercetarea băncii cADN de A. niger N400 pentru (axdA) cu anticorpi împotriva AXDA și izolarea clonelor cADN*

Exemplul 4.1. *Prepararea anticorpilor împotriva AXDA pe un iepure*

Se dializează 500 µg AXDA contra tampon fosfat 1 mM *p*H 7,0 și se liofilizează. Proteina se resuspendă în 1 ml PBS steril (0,136 M NaCl; 2,7 mM Kcl; 8 mM Na_2HPO_4; *p*H 7,4). La acest amestec de proteină se adaugă 1 ml de adjuvant Freunds complet și se barbotează timp de 30 min pentru a obține o emulsie stabilă. Acest amestec se injectează subcutanat la iepure. După 6 săptămâni, se face un rapel prin injectarea a 250 µg AXDA în 0,5 ml PBS steril la care se adaugă 0,5 ml de adjuvant Freunds incomplet. Se ia sânge de la iepure în săptămâna 7 și se testează serul. În săptămâna 13 iepurele primește un al doilea rapel de 250 µg, urmat de o prelevare de sânge în săptămâna 14. Această procedură de rapeluri cu un interval de 6 săptămâni, urmat de o prelevare de sânge poate fi repetată de câteva ori.

Sângele colectat se incubează 30 de min la 37°C și, în continuare, se păstrează la 4°C timp de 16 h. După centrifugare la 5000 rpm într-o centrifugă Sorwall High Speed se colectează serul.

Exemplul 4.2. *Imunocercetarea băncii cADN A. niger N400 cu anticorpi provocați împotriva $AXDA_{TUB}$*

Pentru a cerceta banca cADN *A. niger* N400, construită cum s-a descris în exemplul 3.2, pentru axdA, clone cADN $5x10^3$ pfu/placă se etalează în topagaroză NZYCM conținând 0,7% agaroză pe plăci NZYCM de 85 mm diametru (1,5% agar), așa cum s-a descris (Maniatis, T., E.F. Fritsch, J.Sambrook, 1982, "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*"; Cold Spring Harbor Laboratory, NY, p.64), folosind ca bacterii de etalare *E. coli* BB4.

Se fac două replici de la fiecare placă pe filtre de nitroceluloză (Schlecher și Schüll BA85), așa cum s-a descris de către Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989), în "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", ed. a 2-a, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, p. 12.16-12.17). $AXDA_{NIG}$ se vizualizează folosind anticorpi provocați contra $AXDA_{TUB}$ purificată (exemplul 4.1) după imunocolorare cum s-a descris în **EP 91205944.5 (WO 0463706 A1)**. Se identifică plăcile imunocolorate care apar în duplicat pe filtrele replici; se selectează 8 plăci pozitive. Fiecare placă pozitivă se ridică de pe placă folosind o pipetă Pasteur și fagii se eluează de pe tamponul de agar în 1 ml tampon SM care conține 20 µl cloroform, așa cum s-a descris în Maniatis, T., E.F. Fritsch, J.Sambrook, 1982, "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*"; Cold Spring Harbor Laboratory, NY, p.64. Fagii obținuți se purifică prin repetarea procedurii descrise mai sus, folosind replici filtru de la plăcile care conțin 5-10 plăci ale fagilor izolați.

După purificare, fagii se propagă prin etalarea 5 x 10^3 fagi pe mediu NZYCM. După incubare peste noapte la 37°C, se obțin plăci confluente din care se eluează fagii prin adăugarea a 5 ml tampon SM și păstrarea plăcii 2 h la 4°C cu agitare intermitentă. După colectarea supernatantului folosind o pipetă se îndepărtează bacteriile din soluție prin centrifugare la 4000 x g timp de 10 min la 4°C. Se adaugă la supernatant 0,3% cloroform și se determină numărul de pfu. Aceste stocuri de fagi conțin aproximativ 10^{10} pfu/ml.

Exemplul 4.3. *Analiza de restricție pe clone cADN axdA*

Clonele recombinante Uni-ZAP XR conținând cADN axdA se convertesc la fagemizi Bluescript, folosind suprainfectarea cu fagul filamentos ajutător ExAssist™, care este inclus în trusa de sinteză ZAP™-cADN de la Stratagene, urmând instrucțiunile fabricantului.

Fagemidul ADN se izolează în continuare cum s-a descris în Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989), "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", ed. a 2-a, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, p.1.25-1.28.

ADN-ul izolat al celor 8 clone cADN axdA se supune la analiză de restricție folosind următoarele enzime de restricție: EcoRI și XhoI. Se digeră ADN-ul 2 h la 37°C într-un amestec de reacție compus din următoarele soluții: 2 µl (circa 1 µg) soluție ADN; 2 µl de tampon corespunzător 10*React. (BRL); 10 U din fiecare enzimă de restricție (BRL) și apă distilată sterilă pentru a obține un volum final de 20 µl. După adăugarea a 4 µl tampon de încărcare ADN, probele se încarcă pe un gel TAE-agaroză 0,7%. Fragmentele ADN se separă prin electroforeză la 80 V timp de 1,5 h.

Analiza de restricție arată că clonele cADN axdA au o mărime moleculară de aproximativ 1,2 kb.

Exemplul 4.4. *Analiza secvenței pe clone cADN axdA A. niger*

Structura primară a clonelor cADN se determină prin analiza secvenței combinate cu folosirea oligonucleotidelor specifice ca primeri în reacțiile de secvențare.

Secvențele nucleotidice se determină prin procedura dideoxinucleotidă terminatoare de catenă (Sanger, F., Nickelen, S.,Coulson, A.R. (1977), "*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*", Vol. 74: 5463-5467), folosind trusa de secvențare ADN polimerază T7, Pharmacia. Analiza pe computer se face folosind programul PC/GENE.

Exemplul 4.5. *Marcarea ^{32}P a fragmentului*

Fragmentul clonei cADN axdA *A. niger* se izolează și se marchează așa cum s-a descris în **EP 91205944.5 (WO 463706 A1**, exemplele 2.2 și 7.1,incluse aici ca referințe).

Exemplul 4.6. *Cercetarea băncii genomice a A. niger var. niger pentru gena axdA și izolarea genei*

Pentru cercetarea băncii genomice *A. niger var. niger,* construită așa cum s-a descris de către Harmsen, J.A.M. et al., 1990, "*Curr. Genet.*" 18:161-166, pentru gena axdA $3x10^3$ pfu/placă se etalează în top-agaroză NZYCM care conține 0,7% agaroză pe 5 plăci NZYCM de 85 mm diametru (1,5% agar) așa cum s-a descris (Maniatis, T., E.F. Fritsch, J.Sambrook, 1982, "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*"; Cold Spring Harbor Laboratory, NY, p.64), folosind ca bacterii de etalare *E. coli* LE392.

După incubarea peste noapte a plăcilor la 37°C, se fac două replici ale fiecărei plăci pe filtru HybondN (Amersham) așa cum s-a descris în Maniatis, T., E.F. Fritsch, J.Sambrook, 1982, "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*"; Cold Spring Harbor Laboratory, NY, p. 320-321.

După umezirea filtrelor în 3 x SSC, filtrele se spală 60 min la temperatura camerei în 3 x SSC. Filtrele se prehibridizează la 65°C timp de 2 h în tampon de prehibridizare care conține: 6 x SSC, 0,5% SDS, 10 x soluție Denhardt, 0,01 M EDTA și 100 µg/ml ADN spermatic de hering denaturat termic (Boehringer Mannheim). După 2 h de prehibridizare, tamponul de prehibridizare se înlocuiește cu tampon de hibridizare, care este identic cu tamponul de prehibridizare, dar conține fragmentul care conține clona cADN axdA *A. niger* de 1,2 kb marcat ^{32}P (vezi exemplul 4.3) și preparat așa cum s-a descris în exemplul 4.5. Filtrele se hibridizează 18 h la o temperatură de 65°C.

După hibridizare, filtrele sunt inițial spălate la 65°C, timp de 30 min în 5 x SSC / 0,1% SDS; urmează o a doua spălare la 65°C timp de 30 de min în 2 x SSC / 0,1% SDS. Filtrele sunt spălate apoi la 65°C timp de 30 min cu 0,1 x SSC / 0,1% SDS; urmează o ultimă spălare la 65°C timp de 30 de min în 0,1 x SSC. Filtrele se usucă la aer și se așază pe o fâșie de hârtie Whatman 3MM, se fac semne cu cerneală radioactivă și hârtia Whatman și filtrele se acoperă cu Saran Wrap. Plăcile hibridizate se identifică prin expunerea filmului Kodak XAR la raze X timp de 72 h la -70°C, folosind un ecran de intensificare.

Se găsesc 10 plăci pozitive hibridizate care apar în duplicat pe filtrele replici. Se ridică de pe placă 4 plăci pozitive folosind o pipetă Pasteur și fagii se eluează de pe tamponul de agar în 1 ml tampon SM conținând 20 µl cloroform așa cum s-a descris în Maniatis, T., E.F. Fritsch, J.Sambrook, 1982, "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*"; Cold Spring Harbor Laboratory, NY, p.64.

Fagii obținuți se purifică repetând procedura descrisă mai sus, folosind filtre replici care conțin 50-100 plăci de fagi izolați.

După purificare, fagii se propagă prin întinderea a 5 x 10^3 fagi pe mediu NZYCM. După incubare peste noapte la 37°C, se obțin plăci confluente, din care fagii se eluează adăugând 5 ml tampon SM și păstrarea plăcii timp de 2 h la 4°C cu agitare intermitentă. După colectarea supernatantului folosind o pipetă, se îndepărtează bacteriile din soluție prin centrifugare la 4000 x g timp de 10 min, la 4 °C. La supernatant se adaugă 0,3% cloroform și se determină numărul de pfu. Aceste stocuri de fag conțin circa 10^7 pfu/ml.

Exemplul 4.7. *Izolarea ADN-ului din bacteriofagul lambda*

Fiecare din fagii izolați se propagă combinând 5 x 10^9 bacterii *E. coli* LE392 în 300 µl tampon SM cu 2 x 10^6 fagi și incubare la 37°C timp de 15 min. După perioada de incubare, bacteriile infectate se folosesc pentru a inocula 100 ml mediu NZYCM preîncălzit (37°C) și, în continuare se incubează 9-12 h la 37°C într-un agitator rotativ New Brunswick la 250 rpm perioadă după care bacteriile se lizează. Deșeurile bacteriene se îndepărtează prin centrifugare 10 min la 10000 rpm la 4°C într-o centrifugă Sorvall High Speed. Fagii se precipită din supernatantul obținut (100 ml) prin adăugarea a 10 g polietilenglicol-6000 și 11,7 g NaCl și păstrarea soluției peste noapte la 4°C. Fagii precipitați se colectează prin centrifugare la 14000 x g la 4°C timp de 20 de min. Supernatantul se îndepărtează prin aspirare, ultimele urme de lichid îndepărtându-se prin tamponare cu hârtie. Fagii se resuspendă atent în 4 ml tampon SM și se extrag o dată cu un volum egal de cloroform.

Înainte să se extragă ADN-ul din particulele fagice, ADN-ul și ARN-ul originar din bacteriile lizate se îndepărtează prin incubarea suspensiei fagice cu DNA-ază I și RNA-ază A (ambele 100 µg/ml) timp de 30 min la 37°C. ADN-ul fagic s-a eliberat ulterior din fagi prin adăugare de EDTA până la o concetrația finală de 20 mM în același timp îndepărtându-se proteina din soluție prin extragere de 2 ori cu un volum egal de fenol / cloroform / alcool izoamilic (25:24:1). După separarea fazelor prin centrifugare folosind o centrifugă Solvall (14000 x g, 10 min), faza apoasă s-a extras o dată cu un volum egal cloroform / alcool izoamilic (24:1). Fazele s-au separat prin centrifugare după care ADN-ul s-a precipitat din faza apoasă prin adăugare a 0,1 vol. 5M perclorat de sodiu și 0,1 vol. izopropanol și incubare pe gheață 30 min. Se recuperează ADN-ul prin centrifugare 10 min. la 4°C (14000 x g). Supernatantul se îndepărtează prin aspirare după care ADN-ul se resuspendă în 400 µl tampon TE. Se precipită ADN-ul încă o dată din această soluție, prin adăugarea a 0,1 vol. 3M acetat de sodiu și 2 vol. etanol. Se colectează ADN-ul prin centrifugare 10 min. la 4°C (14000 x g). Supernatantul se îndepărtează prin aspirare, peleta rămasă se usucă sumar la vid, după care ADN-ul se resuspendă în 125 µl tampon TE care conține 0,1 µg/ml RNA-ază A. Această procedură de purificare are ca rezultat izolarea a aproximativ 50-100 µg ADN din fiecare fag.

Exemplul 4.8. *Analiza Southern a fagilor care conțin ADN axdA A. niger var. niger*

Se analizează ADN-ul izolat de la fagii $\lambda_{nigaxd1}$ până la $\lambda_{nigaxd4}$ prin analiză Southern folosind următoarele enzime de restricție: KpnI; SalI; SstI; XbaI; și XhoI și combinațiile KpnI + XbaI; KpnI + SstI; și KpnI + XhoI timp de 5 h la 37°C într-un amestec de reacție compus din următoarele soluții: 5 µl (circa 1 µg) soluție ADN; 2 µl de tampon

corespunzător 10 x React. (BRL); 10 U enzimă de restricție (BRL) și apă distilată sterilă, pentru a da un volum final de 20 µl. După digestie, ADN-ul se precipită prin adăugarea a 0,1 vol. 3M NaAc și 2 vol. etanol. Se colectează ADN-ul prin centrifugare 10 min la temperatura camerei (14000 x g). Supernatantul se îndepărtează prin aspirație, peleta care rămâne se usucă sumar la vid și se resuspendă în apă distilată sterilă. După adăugarea a 4 µl tampon de încărcare ADN, probele se incubează 10 min la 65°C și se răcesc rapid pe gheață înaintea încărcării probelor pe un gel de agaroză 0,6% în tampon TAE. Fragmentele ADN se separă prin electroforeză la 25 V timp de 15-18 h.

După electroforeză, ADN-ul se transferă și se denaturează prin pătare alcalină la vid (VacuGene XL, *p*Harmacia LKB) la membrană de nylon (HybondN, Amersham) așa cum este descris în manualul de instrucțiuni (p.25-26) și, ulterior, se prehibridizează și hibridizează folosind clona cADN axdA *A. niger* marcată așa cum s-a descris în exemplul 4.6 și în condițiile de hibridizare descrise în exemplul 3.3. Imaginea hibridizării se obține prin expunere a filmului Kodak XAR-5 la raze X timp de 18 h la -70°C folosind un ecran de intensificare.

Din rezultatele obținute, se trage concluzia că ADN-ul tuturor celor patru clone izolate a hibridizat cu cADN axdA *A. niger*. În toate cele 4 clone se găsesc fragmente originare din aceeași regiune genomică.

Exemplul 4.9. *Subclonarea genei axdA a A. niger var. niger.*

Fragmentul XhoI de 3,7 kb din $\lambda_{nigaxd1}$ se izolează din gelul de agaroză 0,7% prin metoda comprimării la rece; după electroforeză banda corespunzătoare este desprinsă și agitată cu grijă timp de 30 min în 1 ml soluție FS1 (0,3 M NaAc *p*H 7,0; 1 mM EDTA). Fragmentul de agaroză se transferă într-o eprubetă Eppendorf de 0,5 ml care conține un tampon mic de vată de sticlă tratat cu silicon și un orificiu în bază și se congelează în azot lichid. Eprubeta de 0,5 ml se transferă apoi într-o eprubetă Eppendorf de 1,5 ml și, în continuare, se centrifughează 10 min. Se adaugă la supernatant 1/50 volume de soluție FS2 (0,5 M $MgCl_2$; acid acetic 5%) și 2,5 volume etanol 100%. După 20 min de incubare la -70°C, se colectează ADN-ul prin centrifugare 15 min la 14000 x g la 4°C. După îndepărtarea supernatantului, peletul ADN se usucă folosind o centrifugă cu vid Savant Speedvac. Se dizolvă ADN-ul în 10 µl tampon TE și se determină concentrația prin electroforeză în agaroză folosind ADN lambda cu o concentrație cunoscută ca referință și colorație bromură de etidiu pentru detectarea ADN-ului.

Vectorul pBluescript SK^- se digeră cu XhoI și se defosforilează cu fosfataza alcalină preparată după cum urmează: 1 µl (1 µg/µl) pBluescript se amestecă cu 2 µl 10 * React 2 (BRL), 1 µl (1 U/µl) XhoI și 16 µl apă distilată sterilă. Se digeră ADN-ul 2 h la 37°C după care se adaugă 0,5 µl fosfatază alcalină (1 U/µl) (*p*Harmacia) urmat de o incubare suplimentară la 37°C pentru încă 30 de min. Vectorul linearizat se izolează din gelul de agaroză 0,7% așa cum s-a descris mai sus.

Fragmentul XhoI de 3,7 kb se leagă în vectorul pBluescript SK^- digerat XhoI și defosforilat prin intermediul următoarei proceduri: se amestecă 40 ng fragment pBluescript cu 300 ng fragment XhoI 3,7 kb, 4 µl 5 * tampon de ligare (500 mM Tris-HCl, *p*H 7,6; 100 mM ATP, 10 mM ditiotreitol; 25% PEG-6000) și 1 µl (1 U/µl) ADN ligază T4 (BRL) se adaugă la acest amestec, rezultând un volum final de 20 µl. Plasmidul rezultat este denumit *pIM3002*.

După incubare 16 h la 16°C, amestecul se diluează la 100 µl cu Ca-HEPES *p*H 7,0. Se folosesc 10 µl de amestec diluat pentru a transforma celule competente *E. coli* DH5α preparate după cum urmează: 200 µl dintr-o cultură *E. coli* DH5α precrescută peste noapte în mediu LB (mediu LB per 100 ml: 10 g peptonă tripticază (BBL), 5 g extract de drojdie (BBL), 10 g NaCl, 0,5 mM Tris-HCl *p*H 7,5). Această cultură se incubează la 37°C într-un agitator orbital până când densitatea sa corespunde la $O.D._{600}$ de 0,15-0,2. Apoi, bacteriile se colectează prin centrifugare la 5000 rpm la 4°C. După îndepărtarea supernatantului, celulele se mențin constant pe gheață. Peletul bacterian se spală în 100 ml, 100 mM $MgCl_2$, 5 mM Tris-HCl, *p*H 7,4 prin resuspendarea acestor celule urmată de centrifugare, așa cum s-a descris mai sus. Aceasta se repetă cu 100 ml, 100 mM $CaCl_2$, 5 mM Tris-HCl, *p*H 7,4. În final, celulele se resuspendă în 2 ml 100 mM $CaCl_2$, 5 mM Tris-HCl, *p*H 7,4, 14% glicerol. Alicote (50 µl) se folosesc fie imediat pentru transformare, fie se îngheață la -70°C.

Celulele competente *E. coli* DH5α se folosesc în experimentul de transformare combinând 50 µl suspensie de celule cu 4,5 µl amestec de ligare. După o incubare de 30 de min, pe gheață, celulele se incubează 2 min la 42°C. Apoi, se adaugă 1 ml mediu LB și celulele se incubează la 37°C timp de 1 h. Apoi bacteriile se colectează prin centrifugare la 14000 x g 30 de sec. După îndepărtarea supernatantului, celulele se resuspendă în 200 µl mediu LB. Suspensia bacteriană rezultată se întinde pe mediu LB conținând 100 µg/ml ampicilină, 50 µg/ml X-gal și 60 µg/ml IPTG.

Din coloniile rezultate se cresc 12 peste noapte în mediu LB care conține 100 µg/ml ampicilină. Din culturi, se izolează plasmidul ADN prin metoda lizei alcaline descrise se către Maniatis T., E.F. Fritsch, J. Sambrook (1982), în "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p.368-369, care este folosit în analiza de restricție așa cum s-a descris în exemplul 4.3 pentru a selecta o clonă care adăpostește plasmidul dorit. Plasmidul ADN se izolează pe scară mare din culturi *E. coli* DH5α de 250 ml care conțin plasmidul pIM3002 crescute în mediu LB conținând 100 µg/ml ampicilină folosind trusa Nucleobond PC-500 (Nagel) conform instrucțiunilor producătorului. Plasmidul pIM3002 se analizează ulterior prin enzime de restricție, rezultând harta de restricție prezentată în fig. 4. O mostră a *E. coli* care conține *pIM3002* s-a depozitat pe 28 August 1995 la CBS, Baarn, Olanda, sub numărul CBS 637.95.

Exemplul 4.10. *Supraexpresia genei clonate în A. niger NW219*

Exemplul 4.10.1. *Introducerea axdA A. niger var. niger în A. niger prin cotransformare.*

Plasmidul pIM3002, obținut în exemplul 4.9, se introduce în *A. niger* prin cotransformarea lui *A. niger* NW219 folosind *A. niger* pyrA ca marker de selecție pe plasmidul pGW635 (Goosen, T. et al., 1987, "*Curr Genet*", 11: 499-503) și plasmidul pIM3002 ca plasmid de cotransformare. O mostră a *A. niger* NW219 s-a depozitat pe 25 August 1995, la CBS, Baarn, Olanda, sub numărul CBS 635.95.

Se prepară protoplaști din miceliu prin creșterea *A. niger* NW219 pe mediu minimal suplimentat cu 0,5% extract de drojdie, 0,2% casaminoacizi, 50 mM glucoză, 10 mM nicotinamidă și 10 mM uridină timp de 18 h la 30°C. Prepararea protoplaștilor de *A. niger* NW219 și procedura de transformare se realizează așa cum s-a descris de către Goosen, T. et al., 1987, "*Curr Genet*", 11: 499-503. Transformanții rezultați PYR^+ se analizează pentru expresia genei axdA *A. niger* var. niger prin analiză Western blot.

Exemplul 4.10.2. *Căutarea transformanților pentru expresia genei axdA A. niger var. niger.*

Transformanții obținuți în exemplul 4.10.1 se analizează pentru formarea produsului genei axdA a *A. niger* var. niger, proteina $AXDA_{NIG}$. Se folosesc 19 din acești transformanți într-un experiment de creștere pentru a analiza expresia $AXDA_{NIG}$. Ca tulpină de control se folosește tulpina de tip sălbatic *A. niger* N402. Transformanții se cresc așa cum s-a descris în exemplul 3.1 timp de 24, 40, 48 și 68 h. După creștere, miceliul se îndepărtează prin filtrare și filtratul de cultură se analizează prin Western blot folosind anticorpii provocați împotriva $AXDA_{TUB}$ pe un iepure (exemplul 4.1). Prin această procedură se detectează că 8 din cei 19 transformanți analizați supraproduc proteina $AXDA_{NIG}$.

Exemplul 4.11. *Analiza secvenței și descrierea genei axdA A. niger var. niger.*

Secvența genei axdA *A. niger* var. niger, regiunea sa promotor/reglatoare, partea structurală a genei și regiunea terminatoare se determină prin subclonarea fragmentelor din pIM3002 în pBluescript SK^- și pUC19 în combinație cu folosirea oligonucleotidelor specifice ca primeri în reacțiile de secvențare. Secvența nucleotidică se determină așa cum s-a descris în exemplul 4.4 (Secvența nr. 5).

Secvența obținută cuprinde 2101 bp, 783 bp în regiunea necodificatoare 5' și 322 bp în regiunea necodificatoare 3'. În regiunea necodificatoare 5' se găsește o căsuță TATA la pozițiile 665-670. Partea codificatoare a genei axdA *A. niger* este în lungime de 996 bp și nu este întreruptă prin introni. Gena codifică o proteină în mărime de 332 aminoacizi. Secvența N-terminală, așa cum s-a determinat în exemplul 1.5.1 bazat pe proteina AXDA *A. niger* var. tubigensis, este precedată de o prepeptidă în lungime de 26 aminoacizi. Proteina matură este în mărime de 306 aminoacizi și are o greutate moleculară presupusă de 33101 kDa și un punct izoelectric teoretic de 4,07.

Exemplul 5.1. *Clonarea fragmentului cADN care conține secvențele axdA A. niger var. tubigensis* obținut prin PCR.

Exemplul 5.1.1. *Generarea fragmentelor cADN prin PCR.*

Secvența aminoacidă parțială a fragmentului intern CNBr (Secvența nr. 2) așa cum s-a determinat pentru $AXDA_{TUB}$ se folosește pentru a determina amestecul de oligonucleotide. Derivă următorul amestec: 5'-ATG ATK GTI GAR GCI ATK GG-3' (20-meră) (Secvența nr. 3), în care I este pentru o inozină, K pentru o A, T sau C și R pentru o A sau G. Această oligonucleotidă derivă din secvența aminoacidă internă a $AXDA_{TUB}$ așa cum s-a descris mai sus, în exemplul 1.4.2 de la aminoacidul 1 (I) până la aminoacidul 6 (G). ATG-ul derivă de la metionina care este cunoscută a fi prezentă la capătul N-terminal al fragmentului peptidic datorită mecanismului de clivaj CNBr.

Amestecul oligonucleotidic se folosește în PCR (Saiki, R.K. et al., 1988, "*Science*", 239, 487-491) în combinație cu oligonucleotida T7 (Stratagene) 5'-AAT ACG ACT CAC TAT AG-3' (17-meră) (Secvența nr. 4) folosind cADN care se izolează așa cum s-a descris în exemplul 4.7.

Pentru PCR se combină 2 µl din λ-cADN rezultat cu 5 µl 10 x tampon de reacție (100 mM Tris-HCl, *p*H 8,3; 500 mM KCl; 15 mM $MgCl_2$; 0,01% gelatină), 4,0 µl 1,25 mM din fiecare dintre cele 4 deoxinucleotide trifosfate și 0,5 µg de oligonucleotide într-un volum final de 50 µl. Amestecul de reacție se amestecă și se adaugă 0,5 µl polimerază TAQ (5 U/µl) (HT Biotechnology, Cambridge UK).

Se încălzește ADN-ul și se denaturează prin incubare 3 min la 95°C urmat de 25 de cicluri de 1 min la 95°C, 1 min la 42°C și 1 min la 72°C. După aceste 25 cicluri, amestecul se incubează 5 min la 72°C. Analiza produșilor de reacție arată doi produși distincți de circa 500 bp și 600 bp. Pe baza unei greutăți moleculare aparente de 32 kDa pentru AXDA și greutăți moleculare aparente de 9 kDa pentru peptide CNBr, fragmentul este în limitele așteptate.

Exemplul 5.1.2. *Clonarea și analiza fragmentelor PCR de 500 bp și 600 bp.*

Exemplul 5.1.2.1. *Clonarea fragmentelor PCR de 500 bp și 600 bp.*

Ambele fragmente de 500 bp și 600 bp se leagă într-un vector pGEM™-T (Promega) conform instrucțiunilor fabricantului. După incubare 16 h la 14°C, 4,5 µl amestec de ligare se folosește pentru a transforma celule competente *E. coli* DH5α. Câte 6 dintre coloniile rezultate de la fiecare ligare se cresc peste noapte în mediu LB care conține 100 µg/ml ampicilină. Se izolează ADN din culturile de plasmid prin metoda lizei alcaline așa cum s-a descris de Maniatis, T., E.F. Fritsch, J.Sambrook (1982):"*Molecular Cloning:A Laboratory Manual*", Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p.368-369.

Exemplul 5.1.2.2. *Analiza secvenței fragmentelor PCR de 500 bp și 600 bp.*

Structurile primare ale ambelor fragmente PCR de 500 bp și 600 bp se determină prin secvențarea fragmentelor așa cum s-a descris în exemplul 4.4.

Analiza pe computer a secvenței nucleotidice a ambelor fragmente PCR arată că fragmentul PCR de 600 bp nu are nici o similaritate cu genele cunoscute care degradează arabinoxilan și, prin urmare, se consideră ca un artefact PCR. Secvența nucleotidică a fragmentului PCR de 600 bp este foarte asemănătoare secvenței nucleotidice a clonei cADN prezentate în fig. 4 de la nucleotida 706 până la 1204.

Exemplul 5.2. *Marcarea ^{32}P a fragmentului PCR de 500 bp.*

Fragmentul de 500 bp obținut prin PCR se izolează și se marchează așa cum s-a descris în **EP 912059445 (WO 0463706 A1**, exemplele 2.2 și 7.1incluse aici ca referințe).

Exemplul 5.3. *Cercetarea băncii genomice a A. niger var. tubigensis pentru gena axdA.*

Pentru cercetarea băncii genomice a *A. niger* var. tubigensis, construită așa cum s-a descris în **EP 912059445 (WO 0463706 A1**), exemplul 2, pentru gena axdA 3 x 10^3 pfu/placă se întind așa cum s-a dscris în exemplul 4.6 cu fragmentul PCR de 500 bp marcat ^{32}P, preparat așa cum s-a descris în exemplul 5.1.1, ca sondă.

Se identifică 3 plăci de hibridizare care apar în duplicat pe filtrele replici și se desemnează $\lambda_{tubaxh1}$ până la $\lambda_{tubaxh3}$. Fagii se izolează și se propagă așa cum s-a descris în exemplul 4.6.

Exemplul 5.4. *Analiza Southern a fagilor care conțin ADN axdA de A. niger var. tubigensis.*

Se izolează ADN de la bacteriofagi lambda așa cum s-a descris în exemplul 4.7. se analizează ADN-ul izolat al fagilor $\lambda_{tubaxd1}$ până la $\lambda_{tubaxd3}$ prin analiză Southern folosind următoarele enzime de restricție: *BamHI; EcoRI; HindIII; KpnI; SalI; SstI* și *XhoI*. Analiza Southern se dirijează așa cum s-a descris în exemplul 4.8.

Din rezultatele obținute se ajunge la concluzia că ADN-ul tuturor celor 3 clone a hibridizat cu cADN axdA *A. niger* var. tubigensis. În toate cele 3 clone se găsesc fragmente originare din aceeași regiune genomică.

Exemplul 5.5. *Subclonarea genei axdA a A. niger var. tubigensis.*

Se izolează fragmentul SstI de 5,5 kb de la $\lambda_{tubaxd3}$ și se leagă în vectorul pBluescript SK⁻ digerat SstI și defosforilat așa cum s-a descris în exemplul 4.9, rezultând un plasmid denumit ca *pIM3001*. Plasmidul *pIM3001* se analizează ulterior prin enzime de restricție rezultând harta de restricție prezentată în fig. 6. O mostră a *E. coli* DH5α care adăpostește *pIM3001* s-a depozitat pe 28 august 1995, la CBS, Baarn, Olanda, sub numărul CBS 636.95.

Exemplul 5.6. *Expresia genei axdA clonate A. niger var. tubigensis în A. niger NW219.*

Exemplul 5.6.1. *Introducerea genei axdA A. niger var. tubigensis în A. niger NW219 prin o transformare.*

Plasmidul *pIM3001*, obținut în exemplul 5.5, se introduce în *A. niger* prin cotransformarea lui *A. niger* NW219, așa cum s-a descris în exemplul 4.10.1. Transformanții PYR^+ rezultați se analizează apoi prin analiză Western blot pentru expresia genei axdA *A. niger* var. tubigensis.

Exemplul 5.6.2. *Cercetarea transformanților pentru expresia genei axdA a A. niger var. tubigensis.*

Transformanții obținuți în exemplul 5.6.1 se analizează pentru formarea produsului genei axdA *A. niger* var. tubigensis, proteina $AXDA_{TUB}$. Din acești transformanți, 19 se folosesc într-un experiment de creștere pentru a analiza expresia pentru $AXDA_{TUB}$. Tulpina *A. niger* N402 se folosește ca un control de tip sălbatic. Transformanții se cresc așa cum s-a descris în exemplul 3.1 timp de 20, 41, 60 și 86 h. După creștere, miceliul se îndepărtează prin filtrare și filtratul de cultură se analizează prin Western blot folosind anticorpii provocați împotriva $AXDA_{TUB}$ pe un iepure (exemplul 4.1). Din cei 19 transformanți analizați, 12 produc proteina $AXDA_{TUB}$ așa cum s-a detectat prin această procedură.

Exemplul 5.7. *Analiza secvenței și descrierea genei axdA a A. niger var. tubigensis*

Secvența genei axdA a *A. niger* var. tubigensis, regiunea sa promotor/ reglatoare, partea structurală a genei și regiunea terminatoare se determină prin subclonarea fragmentelor din *pIM3001* în pBluescript SK⁻ și *pUC19* în combinație cu folosirea oligonucleotidelor specifice ca primeri în reacțiile de secvențare. Secvența nucleotidică se determină așa cum s-a descris în exemplul 4.4 (vezi secvența nr. 7).

Secvența obținută cuprinde 2859 bp, 823 bp în regiunea necodificatoare 5' și 1041 bp în regiunea necodificatoare 3'. În regiunea 5' necodificatoare se găsește o căsuță CAAT la pozițiile 651-655 și căsuța TATA se găsește la pozițiile 713-720. Partea codificatoare a genei axdA *A. niger* var. tubigensis este în lungime de 996 bp și nu este întreruptă prin introni. Gena codifică o proteină în mărime de 332 aminoacizi. Secvența N-terminală determinată ca în exemplul 1.5.1 este precedată de o prepeptidă în lungime de 26 aminoacizi. Proteina matură este în mărime de 306 aminoacizi și are o greutate moleculară presupusă de 33250 kDa și un punct izoelectric teoretic de 4,20.

Exemplul 6. *Digestia in vitro a porumbului cu AXDA*

Exemplul 6.1. *Izolarea solidelor insolubile în apă (WIS)*

Pentru sistemul de digestie *in vitro* se izolează fracțiunea polimerică insolubilă. Se macină porumb (3 mm) într-o moară Retsch și se degresează cu hexan (construcție Soxlet pentru distilare) timp de 6 h.

După degresare, porumbul se usucă la 105°C și se macină din nou (1 mm, moară Retsch). La 400 g porumb degresat se adaugă 1,5 l 1,5% SDS / 0,05% β-mercaptoetanol și se agită la temperatura camerei 1 h (pentru degradarea proteinelor) după care se centrifughează 15 min la 24000 x g. După denaturarea proteinei, peletul se spală de trei ori cu 1 l SDS / β-mercaptoetanol și de 2 ori cu 1 l de apă demineralizată. Peletul se resuspendă în 4 l apă demineralizată și se sitează pe 32 μm. Procedura de spălare și sitare se repetă. Peletul fracțiunii WIS brut (mai mare de 32 μm) se dizolvă într-un litru tampon maleat (*p*H 6,5) și se incubează la 90°C, 50 min. Se adaugă 2 mg α-amilază (Maxamyl™ Gist-brocades) și se incubează 16 h la 30°C, după care se centrifughează 15 min (24000 x g). Digestia enzimatică se repetă, după care peletul se spală de 3 ori cu apă demineralizată de 65°C. Peletul (WIS) se liofilizează. WIS-ul conține 30% xiloză, 29% arabinoză, 23% glucoză și 7% galactoză. Se determină că glucoza nu este amidon (trusă de testare amidon Boehringer Mannheim).

Exemplul 6.2. *Sistem de digestie in vitro la păsări domestice*

Se determină conținutul de substanță uscată al WIS (95,73%) prin determinarea greutății WIS înainte și după uscare la 120°C.

În sistemul de digestie *in vitro* la păsări de curte la 1 g de WIS se adaugă 200 μl NaN_3 (Merck) și 1 ml standard intern (sorbitol 35 mg/ml, Sigma). Pentru digestia enzimatică în gușă (cu (200 μg proteină) sau fără enzimă) proba se umple cu tampon (NaAc, *p*H 5,5) până la 15 ml și se incubează la 39°C timp de 1 h. Pentru digestie în stomac, se adaugă 5 ml pepsină (5,28 g/l, *p*H 3,0; Merck) și se incubează pentru 1,5 h la 39°C. Pentru digestie intestinală, se adaugă 2,5 ml de săruri pancreatice / biliare (16 g/l, respectiv 0,1 g/l; Merck) și se incubează 1,5 h la 39°C. Proba se centrifughează 15 min (2800 g). Se folosește supernatantul pentru a măsura monozaharidele (HPLC, Spectra *p*Hysics; coloană HPX-87P, Biorad) care se eliberează în timpul digestiei enzimatice. Peletul se usucă la 120°C și se determină greutatea. Se calculează procentul de materie uscată.

Drept control în sistemul *in vitro* se adaugă o doză răspuns a preparatului enzimei brute (rezultatele sunt prezentate în fig. 3). Enzima AXDA (se adugă 200 μg de proteină AXDA) arată o creștere considerabilă a digestiei materiei uscate comparativ cu martorul. Procentul digestiei substanței uscate de 15,8% pe fracția WIS de porumb este crescut cu 4,1% față de blanc-ul WIS de porumb.

Exemplul 7. *Experiment de digestibilitate in vitro cu WIS de porumb*

Exemplul 7.1. *Izolarea WIS de porumb*

Izolarea WIS de porumb se face cum s-a descris în exemplul 6, cu unele modificări datorită incubării SDS / mercaptoetanol care nu se poate aplica la hrana animalelor. Procedura de izolare se efectuează pe 1 kg porumb degresat. La 1 kg porumb degresat, se adaugă 4 g papaină (Gist-brocades) / 100 g proteină de porumb și se suspendă la 30°C, 2 h. După aceasta, suspensia se digeră cu Maxamyl™ (Gist-brocades) (2 ml/l) la 100°C și se centrifughează (15 min, 24000 g). Supernatantul se îndepărtează și procedura de digestie enzimatică se repetă asupra peletului. Suspensia este centrifugată din nou și se spală de 3 ori cu apă demineralizată (1 l). După spălare, peletul (solide insolubile în apă) se liofilizează.

Conținutul mono/oligozaharide în WIS de porumb se determină printr-o analiză acid trifluoracetic (TFA). La 0,3 g de WIS se adaugă 1 ml 35 mg/ml sorbitol (standard intern), 2 ml apă demineralizată și 450 μl TFA urmat de hidroliză 1 h la 120°C.

După răcire, se adaugă 20 ml de apă demineralizată și hidrolizarea se continuă 1 h la 120°C. După coborârea temperaturii, probele se liofilizează și se resuspendă în 3 ml de apă demineralizată. Monozaharidele se îndepărtează pe o coloană HPX-87P (Biorad) într-un sistem HPLC (Spectra *p*Hysics). Fracțiunea polimerică WIS a porumbului conține: 124,8 mg/g xiloză; 96,6 mg/g arabinoză; 28,2 mg/g galactoză și 156,0 mg/g glucoză. Datorită conținutului ridicat de glucoză, fracțiunea WIS se analizează pentru amidon (trusă de testare amidon, Boehringer Mannheim). Se găsește că fracțiunea WIS nu conține nici un amidon.

Exemplul 7.2. *Experiment de digestibilitate cu broileri*

Se realizează un experiment pentru detectarea influenței enzimei AXDA asupra conținutului energetic metabolizabil real al unei diete la care se adaugă 20% WIS de la porumb. Metoda folosită este "sibbald-assay" modificată.

Broileri masculi (în vârstă de 3 săptămâni) se adăpostesc individual în cuști într-o cameră cu mediu controlat. Animalele sunt înfometate 48 h. Apoi se alimentează prin tub o cantitate de hrană determinată exact. Pentru corectarea pierderii de energie endogenă pe care o conțin componentele, în experiment se include un grup de control. Aceste animale sunt hrănite cu 10 g B-glucoză, în timp ce altele au primit 10 g de hrană. Fiecare tip de hrană se dă la 6 animale. Pentru controlul glucozei, se constituie un grup alcătuit din 5 animale.

Animalele sunt înfometate pentru alte 48 h, perioadă în care se colectează cantitativ excrementele. Excrementele sunt păstrate la -20°C până când se realizează analiza. În timpul acestei perioade, apa este accesibilă animalelor o singură dată, printr-un tub.

Digestele colectate se liofilizează și se cântăresc după echilibrare la aer. În probele de hrană și în probele de materie uscată a digestelor se analizează conținuturile de azot și energie.

Pentru corectarea rezultatelor experiențelor pe animale de control, se folosesc animale hrănite conform unor diete experimentale. Metoda aplicată este o adaptare a procedurilor experimentale descrise de Mcnab, J.M., Blair, J.C., (1988), *"British Poultry Science"* 29: 697-707. În această lucrare, este dată o descriere a metodelor și analizelor, și a calculului.

De asemenea, se realizează măsurători ale digestibilității materiei uscate *in vitro* pentru metoda descrisă în exemplul 6.2.

Tratamentele experimentale sunt după cum urmează:

I hrană de bază porumb (tabel 2)
II hrană de bază porumb + 10% WIS de porumb
III hrană de bază porumb + 20% WIS de porumb
IV hrană de bază porumb+20% WIS de porumb+100 mg/kg AXDA
V hrană de bază porumb + 20% WIS de porumb + 45 mg/kg enzimă brută
VI hrană de bază porumb + 20% WIS de porumb + 90 mg/kg enzimă brută
VII hrană de bază porumb + 20% WIS de porumb + 200 mg/kg endoxilanază.

Compoziția dietei de bază este dată în tabelul 2.

Compoziția dietei de bază folosită în experiment

Tabelul 2

Conținutul hranei de bază	Compoziție (%)
Porumb	50,00
Tapioca	19,69
Făină de soia (50% proteină brută)	19,45
Făină de carne și oase	3,60
Mazăre (22,8% cp)	3,50
Făină de pește (74% cp)	1,00
Ulei de soia	1,00
Făină de pene (hidrolizată)	1,00
Monofosfat de calciu	1,23
Piatră de var (carbonat de calciu)	0,90
Sare	0,30
L-lizină.HCl	0,13
DL-metionină	0,20
Premix vitamine/minerale*	1,00

* Premixul vitamine/minerale eliberat/ kg de hrană: riboflavină, 4 mg; niacină, 40 mg; acid d-pantotenic, 12 mg; clorură de colină, 500 mg; B12, 15 µg; E, 15 mg; K3, 5 mg; retinilacetat, 3,44 mg; colecalciferol, 50 µg; biotină, 0,1 mg; acid folic, 0,75 mg; $FeSO_4.7H_2O$, 300 mg; MgO_2, 100 mg; $CuSO_4.5H_2O$, 100 mg; $ZnSO_4.7H_2O$, 150 mg; Na_2SeO_3, 0,15 mg; antioxidant, 100 mg; și virginiamicină, 20 mg.

Rezultatele (energie metabolizabilă reală corectată pentru azot (TMEn) și rezultatele testului *in vitro*) sunt date în tabelul 3.

Energia metabolizabilă reală (corectată pentru azot: TMEn) și digestibilitatea in vitro a materiei uscate

Tabelul 3

Tratament	Enzima adăugată	TMEn (kJ/g)	Digestia *in vitro* (%)
I	-	13,59 a*)	36,4
II	-	12,39 b	36,2
III	-	11,17 c	31,9
IV	AXDA	12,37	39,7
V	enzimă brută	11,87bc	31,4
VI	enzimă brută	11,63bc	33,2
VII	endoxilanază	11,95b	32,6

*) Eroare standard reziduală: 0,42

LSD (5%): 0,76

Valorile TMEn cu o literă diferită sunt semnificativ diferite (P este mai mic decât 0,05) conform testului LSD.

Nivelul TMEn descreşte semnificativ cu creşterea adăugării WIS de porumb.

Toate preparatele enzimatice îmbunătăţesc valorile TMEn, dar numai pentru endoxilanază (+ 7,0%) şi pentru AXDA (+ 10,7%) aceasta este semnificativă. Conform valorilor medii, AXDA îmbunătăţeşte valoarea energetică până la nivelul hranei de bază suplimentată cu 10% WIS de porumb.

În modelul *in vitro*, care simulează procesul digestiv la pui, AXDA îmbunătăţeşte important digestia materiei uscate (+ 24,5%). Endoxilanaza şi preparatul enzimatic brut în acest model nu sunt la fel de eficiente ca AXDA.

Exemplul 8. *AXDA în prepararea pâinii*

Se testează AXDA într-un test de producere a unei franzele folosind tăvi pentru pâine. Franzelele se coc din bucăţi de pastă de 150 g obţinută prin amestecarea a 200 g făină (Robijn™/Columbus™80/20), 104 ml apă, 1,4 g drojdie de panificaţie uscată (Fermipan™) 4 g sare, 3 g zahăr, 400 mg $CaCl_2.2H_2O$, 3 mg (15ppm) acid ascorbic, 5 mg (25 ppm) alfa-amilază fungică (Fermizyme™P200) şi 25 µg de AXDA purificată. După amestecare 6 min şi 15 sec la 52 rpm într-un amestecător cu braţe, pasta se divizează, se lasă la întărit 45 min la 30°C, se frământă, se lasă la întărit pentru alte 25 min, se modelează şi se aşază în formă. După o întărire finală de 70 min la 30°C, aluatul se coace 20 de min la 225°C. Volumul franzelei se determină prin metoda dislocuirii semînţei de rapiţă. Volumul franzelei creşte de la 490 ml (control) la 535 ml pentru franzelele care conţin AXDA, adică o creştere de 9%.

Revendicări

1. Polipeptidă cu activitate de degradare a arabinoxilanului, **caracterizată prin aceea că** secvenţa de aminoacizi este dată în secvenţa nr. 6 sau secvenţa nr. 8, precum şi în porţiuni ale acesteia, care au activitate de degradare a arabinoxilanului.

2. Polipetidă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** se foloseşte ca aliment sau la prelucrarea hârtiei şi celulozei.

3. ADN recombinant cuprinzând un fragment de ADN care codifică o polipeptidă având activitate de degradare a arabinoxilanului, definită în revendicarea 1 sau o polipeptidă precursor al acesteia, **caracterizat prin aceea că** fragmentul de ADN este ales dintre:

(a) un fragment ADN care codifică o polipeptidă având secvenţa de aminoacizi reprezentată prin aminoacizii 1...306 din secvenţa nr. 5, sau un precursor al polipeptidei menţionate, reprezentat prin aminoacizii 27...306 din secvenţa nr. 5;

(b) un fragment ADN care codifică o polipeptidă având secvenţa aminoacidă reprezentată prin aminoacizii 1...306 din secvenţa nr. 7 sau un precursor al polipeptidei menţionate, reprezentat prin aminoacizii 27...306 din secvenţa nr. 7;

(c) un fragment ADN care codifică o porţiune a polipeptidelor reprezentate prin resturile de aminoacizi 1...306 ilustrate în secvenţa nr. 5 sau 7 care are încă activitate de degradare a arabinoxilanului sau o polipeptidă precursoare a acestora;

(d) un fragment ADN care codifică o polipeptidă cu activitate de degradare a arabinoxilanului şi având secvenţa nucleotidică reprezentată prin nucleotidele 784-1779 din secvenţa nr. 5 sau nucleotidele 823...1818 din secvenţa nr. 7;

(e) un fragment ADN care codifică o polipeptidă cu activitate de degradare a arabinoxilanului sau o parte a unei astfel de polipeptide, fragment ADN care este capabil să hibridizeze la un fragment ADN precum cel reprezentat prin nucleotidele 784...1779 în secvența nr. 5 sau nucleotidele 823...1818 din secvența nr. 7;
iar respectivul ADN recombinant mai poate cuprinde, în plus, secvențe ADN regulatoare necesare pentru expresia fragmentului ADN într-o celulă procariotă sau eucariotă, reprezentate prin secvențele de nucleotide 1...783 din secvența nr. 5 sau un subfragment al acesteia capabil să regleze expresia unei secvențe ADN atașată de el sau secvențele de nucleotide reprezentate prin nucleotidele 1...822 din secvența nr. 7 sau un subfragment al acesteia capabil să regleze expresia unei secvențe ADN atașată lui.

4. ADN conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că** secvențele ADN regulatoare sunt heteroloage față de secvența respectivului fragment ADN, care codifică polipeptida.

5. ADN conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că** secvențele ADN regulatoare sunt selectate astfel, încât sporesc expresia fragmentului ADN într-o gazdă, comparativ cu expresia fragmentului ADN în gazda menționată, atunci când este legat la secvențele ADN regulatoare omoloage pentru el.

6. ADN conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că** activitatea de degradare a arabinoxilanului se obține de la un fung filamentos.

7. ADN conform revendicărilor 3 și 4, **caracterizat prin aceea că** fungul filamentos este o specie de *Aspergillus*.

8. ADN conform revendicărilor 3 și 5, **caracterizat prin aceea că** fungul filamentos este *Aspergillus niger* sau *Aspergillus tubigensis*.

9. ADN conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că** este sub forma unui vector.

10. ADN conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că** transformă o celulă gazdă eucariotă sau procariotă, care îl conține.

11. ADN conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că** transformă o celulă gazdă eucariotă, care aparține genului *Aspergillus*.

12. Procedeu de obținere a unei polipeptide definită în revendicarea 1, prin intermediul celulelor ce conțin ADN-ul recombinant definit în revendicarea 3, **caracterizat prin aceea că**, celulele obținute prin introducerea ADN-ului recombinant se selecționează, se dezvoltă în mediu de fermentație nutritiv convențional conținând o sursă de carbon, o sursă de azot, o sursă de azot organic, surse nutritive anorganice și, opțional, un inductor - arabinoxilan, se lasă să fermenteze o perioadă de 0,5...20 zile într-un procedeu discontinuu sau discontinuu cu alimentare, la temperatura de 0...45°C și la un *pH* de 2...10, apoi se îndepărtează celulele prin centrifugare sau filtrare, se recuperează enzima și, opțional, se purifică.

13. Compoziție alimentară, **caracterizată prin aceea că**, conține polipeptida definită în revendicarea 1 și un aditiv acceptabil din punct de alimentar.

14. Compoziție conform revendicării 13, **caracterizată prin aceea că** polipeptida este imobilizată.

LISTA DE SECVENȚE

(1) INFORMAȚIE GENERALĂ:

(i) SOLICITANT:
(A) NUME: GIST-BROCADES
(B) STRADA:WATERINGSEWEG
(C) ORAȘ: DELFT
(E) ȚARA: OLANDA
(F) COD POȘTAL (ZIP): 2611XT

(ii) TITLUL INVENȚIEI: POLIPEPTIDĂ CU ACTIVITATE DE DEGRADARE A ARABINOXILANULUI, ADN RECOMBINANT CE O CODIFICĂ PROCEDEU DE OBȚINERE ȘI COMPOZIȚIE FARMACEUTICĂ CU ACEASTA

(iii) NUMĂR DE SECVENȚE: 8

(v) FORMA LIZIBILĂ PE COMPUTER:
(A) TIP MEDIU: Floppiy disk
(B) COMPUTER: PC compatibil IBM
(C) SISTEM DE OPERARE: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: Patentin Release nr. 1.0, Versiune nr. 1,25EPO

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID nr.1

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:
(A) LUNGIME: 8 aminoacizi
(B) TIP: aminoacid
(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(iii) IPOTETIC: NU

(iv) ANTI-SENS: NU

(v) TIP FRAGMENT: N-terminal

(xi) DESCRIERE SECVENȚEI: SECV. ID nr.1

Lys Xaa Ala Leu Pro Ser Ser Tyr
1 5

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR.2

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:
(A) LUNGIME: 17 aminoacizi
(B) TIP: aminoacid
(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(iii) IPOTETICĂ: NU

(iii) ANTI-SENS: NU

(v) TIPUL DE FRAGMENT:intern

(vi) SURSA ORIGINALĂ:
(A) ORGANISM: *Aspergillus niger* var. *tubigensis*
(B) TULPINA: *DS168813*

(xi) CARACTERISTICĂ:
(A) NUME/COD: rest aminoacid
(B) LOCALIZARE: 14
(C) ALTĂ INFORMAȚIE: Arg sau Asn
(xi) CARACTERISTICĂ:
(A) NUME/COD: rest aminoacid
(B) LOCALIZARE: 15
(C) ALTĂ INFORMAȚIE: rest=nesigur
(xi) CARACTERISTICĂ:
(A) NUME/COD: rest aminoacid
(B) LOCALIZARE: 16
(C) ALTĂ INFORMAȚIE: rest=nesigur
(xi) CARACTERISTICĂ:
(A) NUME/COD: rest aminoacid
(B) LOCALIZARE: 17
(C) ALTĂ INFORMAȚIE: rest=nesigur
(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr.2:

Ile Val Glu Ala Ile Gly Ser Thr Gly His Arg Tyr Phe Xaa Ser Phe Thr
1 5 10 15

(2) INFORMAȚIA PENTRU SECV. ID NR.3

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:
(A) LUNGIME: 20 baze perechi
(B) TIP: acid nucleic
(C) ÎMPLETIRE: simplă
(D) TOPOLOGIE: lineară
(ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)
(iii) IPOTETICĂ: NU
(iii) ANTI-SENS: NU
(vi) SURSA ORIGINALĂ:
(A) ORGANISM: *Aspergillus niger* var. *tubigensis*
(B) TULPINA: *DS168813*
(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr.3:

ATGATKGTIG ARGCIATKGG

(2) INFORMAȚIA PENTRU SECV. ID NR.4

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:
(A) LUNGIME: 17 baze perechi
(B) TIP: acid nucleic
(C) ÎMPLETIRE: simplă
(D) TOPOLOGIE: lineară
(ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)

(iii) IPOTETICĂ: NU
(iii) ANTI-SENS: NU
(vi) SURSA ORIGINALĂ:
(A) ORGANISM: *Aspergillus niger* var. *tubigensis*
(B) TULPINA: *DS168813*
(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr.4:

AATACGACTC ACTATAG

(2) INFORMAȚIA PENTRU SECV. ID NR.5

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:
(A) LUNGIME: 2101 baze perechi
(B) TIP: acid nucleic
(C) ÎMPLETIRE: simplă
(D) TOPOLOGIE: lineară
(ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)
(iii) IPOTETICĂ: NU
(iii) ANTI-SENS: NU
(vi) SURSA ORIGINALĂ:
(A) ORGANISM: *Aspergillus niger*
(B) TULPINA: *CBS 120.49*
(xi) CARACTERISTICĂ:
(A) NUME/COD: TATA semnal
(B) LOCALIZARE: 665...670
(xi) CARACTERISTICĂ:
(A) NUME/COD: CDS
(B) LOCALIZARE: 748...1779
(C) ALTĂ INFORMAȚIE: /produs="enzima care degradează arabinoxilanul"
/gena="axdA"
/nume standard="enzima care degradează arabinoxilanul"
(xi) CARACTERISTICĂ:
(A) NUME/COD: sig-peptidă
(B) LOCALIZARE: 784...1779
(xi) CARACTERISTICĂ:
(A) NUME/COD: rest aminoacid
(B) LOCALIZARE: 862...1779
(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr.5

```
CTGATTGGGA TTCTGCAGGA ATTCTCTGGG GTATGCCAAA AAAGTATACC GACCTGTAAA   60
AGTCCAACCA GTTCGAAATT ACTAACAATA TGTTTTTGAT CAGGATATCT TTGGCATCTA  120
TGGTGAGAGC CATATCATCA TCTCTTCTTC CGGCAGCTGT CAACTGCCTG CCGAAAGTAC  180
TGGAAGCCAT TGTGTTTTAA GGTGAAACAA GATCAGGGCG GCTATGTGTC AGGGTAGAAC  240
CAGTTTGCTT AGCGCCATCA GGGTCCACGT CTAGACTTTC GATGCCCGGA GTTATTCGCC  300
TTCCCACAGC AGTCATTTCC CCGAATCTAA ACCGATGGAC GGATATTGTG GTGTAATGAT  360
AGAACAACAC GGTGTAGTGT AGTTTTAAGT GCCGTGCTAG ACACGGCAAC GTTCCGGTGG  420
GCGATTGTTT CTGGCTAATG TACTCCGTAG TTTAGGCAAC AGGCCGATCA TCTTCCCCCA  480
TAGGAAAGGA CCCTGAATAG TGCGTCAAAA AGAGCTTGAG GCAAAGGAGG ACTGCACTTT  540
```

```
CCAAGGCCGA AGTGGGGGGG GGGGATAACC AAGCAGCCCA ACTTTTATCC GAAACCTTTC   600

AGGTGTCATC TAATTTGGAT AAATCCGCAT TGTTCTTCGG CATATGTGGA TGTCACCATG   660

AGCCATAAAT ACAAATATCT GGACAAGCTG TTGCCCTTTG TTCAAGTTAT TCGTTCTCTG   720

TGGACCACGA TCCCAACCAT TGATCTCTTT TGTTTGTTCC TCAGCGGATA AGTCATACG    780

AAA ATG AAA TTC CTC AAA GCC AAG GGT AGC TTG CTG TCG TCT GGC ATA       828
    Met Lys Phe Leu Lys Ala Lys Gly Ser Leu Leu Ser Ser Gly Ile
       -25                 -20                 -15

TAC CTC ATT GCA TTG GCC CCC TTT GTC AAC GCA AAA TGC GCT CTT CCG      876
Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Pro Phe Val Asn Ala Lys Cys Ala Leu Pro
   -10                 -5                  1                   5

TCG ACA TAT AGT TGG ACT TCG ACC GAT GCT CTC GCC ACC CCA AAG TCC      924
Ser Thr Tyr Ser Trp Thr Ser Thr Asp Ala Leu Ala Thr Pro Lys Ser
                10                  15                  20

GGA TGG ACT GCA CTC AAG GAC TTC ACC GAT GTC GTC TCT AAC GGC AAA      972
Gly Trp Thr Ala Leu Lys Asp Phe Thr Asp Val Val Ser Asn Gly Lys
            25                  30                  35

CAT ATT GTC TAT GCG TCC ACT ACC GAC ACA CAG GGA AAT TAC GGC TCC     1020
His Ile Val Tyr Ala Ser Thr Thr Asp Thr Gln Gly Asn Tyr Gly Ser
        40                  45                  50

ATG GGC TTT GGC GCC TTT TCG GAC TGG TCG GAC ATG GCA TCC GCT AGT     1068
Met Gly Phe Gly Ala Phe Ser Asp Trp Ser Asp Met Ala Ser Ala Ser
    55                  60                  65

CAA ACG GCC ACA AGC TTC AGC GCC GTA GCT CCA ACC TTG TTC TAC TTC     1116
Gln Thr Ala Thr Ser Phe Ser Ala Val Ala Pro Thr Leu Phe Tyr Phe
70                  75                  80                  85

CAG CCA AAG AGT ATC TGG GTT CTG GCC TAC CAA TGG GGC TCC AGC ACT     1164
Gln Pro Lys Ser Ile Trp Val Leu Ala Tyr Gln Trp Gly Ser Ser Thr
                90                  95                  100

TTC ACC TAC CGC ACC TCT CAA GAT CCC ACC AAT GTC AAC GGC TGG TCA     1212
Phe Thr Tyr Arg Thr Ser Gln Asp Pro Thr Asn Val Asn Gly Trp Ser
            105                 110                 115

TCC GAG CAA GCT CTT TTC ACG GGC AAA ATC AGC GGC TCA AGT ACC GGT     1260
Ser Glu Gln Ala Leu Phe Thr Gly Lys Ile Ser Gly Ser Ser Thr Gly
        120                 125                 130

GCC ATT GAT CAG ACT GTG ATT GGT GAT GAT ACG AAT ATG TAT CTT TTC     1308
Ala Ile Asp Gln Thr Val Ile Gly Asp Asp Thr Asn Met Tyr Leu Phe
    135                 140                 145

TTT GCC GGC GAC AAT GGC AAG ATC TAC CGA TCC AGC ATG TCT ATC AAT     1356
Phe Ala Gly Asp Asn Gly Lys Ile Tyr Arg Ser Ser Met Ser Ile Asn
150                 155                 160                 165

GAC TTC CCC GGA AGC TTC GGC AGC CAG TAC GAG GAG ATC CTC AGC GGC     1404
Asp Phe Pro Gly Ser Phe Gly Ser Gln Tyr Glu Glu Ile Leu Ser Gly
                170                 175                 180

GCG ACC AAC GAT TTG TTC GAG GCG GTC CAA GTG TAC ACC GTC GAC GGC     1452
Ala Thr Asn Asp Leu Phe Glu Ala Val Gln Val Tyr Thr Val Asp Gly
            185                 190                 195

GGC GAG GGT GAC AGC AAG TAC CTC ATG ATC GTC GAG GCG ATC GGT TCC     1500
Gly Glu Gly Asp Ser Lys Tyr Leu Met Ile Val Glu Ala Ile Gly Ser
        200                 205                 210
```

```
ACC GGA CAT CGT TAT TTC CGC TCC TTC ACG GCC AGC AGT CTC GGC GGA      1548
Thr Gly His Arg Tyr Phe Arg Ser Phe Thr Ala Ser Ser Leu Gly Gly
    215                 220                 225

GAG TGG ACA GCC CAG GCG GCA AGT GAA GAT CAA CCC TTC GCG GGC AAA      1596
Glu Trp Thr Ala Gln Ala Ala Ser Glu Asp Gln Pro Phe Ala Gly Lys
230                 235                 240                 245

GCC AAC AGT GGC GCC ACC TGG ACC GAC GAC ATC AGT CAT GGT GAC TTG      1644
Ala Asn Ser Gly Ala Thr Trp Thr Asp Asp Ile Ser His Gly Asp Leu
                250                 255                 260

GTT CGC AAC AAC CCT GAT CAA ACC ATG ACG GTC GAT CCT TGC AAC CTC      1692
Val Arg Asn Asn Pro Asp Gln Thr Met Thr Val Asp Pro Cys Asn Leu
            265                 270                 275

CAG CTT CTC TAC CAG GGC CAT GAC CCC AAC AGC AAT AGT GAC TAC AAC      1740
Gln Leu Leu Tyr Gln Gly His Asp Pro Asn Ser Asn Ser Asp Tyr Asn
        280                 285                 290

CTC TTG CCC TGG AAG CCA GGA GTT CTT ACC TTG AAG CAG TGAAAGGCTT       1789
Leu Leu Pro Trp Lys Pro Gly Val Leu Thr Leu Lys Gln
    295                 300                 305

ATCATTTGGT TGCAGACCGG GGTTTTCTTC CCCTTCCTTG AGTAGTATTG TTGGTGGAAG    1849

ACAGCGGGAT GGGGAGTGAA TACTATCTTG GGCTCAATTG AGGTGGAATC CTGTCAGACT    1909

GTGTACATAG GCTACATGCG AATGATTTGG TTTATTCACA AATAGTATTA ACAGATAGTG    1969

TAGTATACAC CTCTGTATTC ACAGGTGATA GCCTGTCTAC TAGTAGTAGA GATGTGGCTC    2029

GAGATGACTG CACGTGATGA TCACATCATC ATCATCGCAG TCGCTCACGC GACAGTCTCA    2089

GACACACACA TA                                                       2101
```

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR.6:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 332 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: peptidă

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr. 6:

75 80 85

Pro Lys Ser Ile Trp Val Leu Ala Tyr Gln Trp Gly Ser Ser Thr Phe
90 95 100

Thr Tyr Arg Thr Ser Gln Asp Pro Thr Asn Val Asn Gly Trp Ser Ser
105 110 115

Glu Gln Ala Leu Phe Thr Gly Lys Ile Ser Gly Ser Ser Thr Gly Ala
120 125 130

Ile Asp Gln Thr Val Ile Gly Asp Asp Thr Asn Met Tyr Leu Phe Phe
135 140 145 150

Ala Gly Asp Asn Gly Lys Ile Tyr Arg Ser Ser Met Ser Ile Asn Asp
155 160 165

Phe Pro Gly Ser Phe Gly Ser Gln Tyr Glu Glu Ile Leu Ser Gly Ala
170 175 180

Thr Asn Asp Leu Phe Glu Ala Val Gln Val Tyr Thr Val Asp Gly Gly
185 190 195

Glu Gly Asp Ser Lys Tyr Leu Met Ile Val Glu Ala Ile Gly Ser Thr
200 205 210

Gly His Arg Tyr Phe Arg Ser Phe Thr Ala Ser Ser Leu Gly Gly Glu
215 220 225 230

Trp Thr Ala Gln Ala Ala Ser Glu Asp Gln Pro Phe Ala Gly Lys Ala
235 240 245

Asn Ser Gly Ala Thr Trp Thr Asp Asp Ile Ser His Gly Asp Leu Val
250 255 260

Arg Asn Asn Pro Asp Gln Thr Met Thr Val Asp Pro Cys Asn Leu Gln
265 270 275

Leu Leu Tyr Gln Gly His Asp Pro Asn Ser Asn Ser Asp Tyr Asn Leu
280 285 290

Leu Pro Trp Lys Pro Gly Val Leu Thr Leu Lys Gln
295 300 305

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 7

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 2859 baze perechi

(B) TIP: acid nucleic

(C) ÎMPLETIRE: simplă

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: ADN (genomic)

(iii) IPOTETICĂ: NU

(iii) ANTI-SENS: NU

(vi) SURSA ORIGINALĂ:

(A) ORGANISM: *Aspergillus niger* var. *tubigensis*

(B) TULPINA: *DS16813*

(xi) CARACTERISTICĂ:

(A) NUME/COD: CAAT-semnal

(B) LOCALIZARE: 651...655

(xi) CARACTERISTICĂ:

(A) NUME/COD: TATA-semnal

(B) LOCALIZARE: 713...720

(xi) CARACTERISTICĂ:

(A) NUME/COD: CDS

(B) LOCALIZARE: 823...1818

(C) ALTĂ INFORMAȚIE: /produs="enzima care degradează arabinoxilanul"
/gena="axdA"
/nume standard="enzima care degradează arabinoxilanul"

(xi) CARACTERISTICĂ:

(A) NUME/COD: sig-peptidă

(B) LOCALIZARE: 823...901

(xi) CARACTERISTICĂ:

(A) NUME/COD: mat peptidă

(B) LOCALIZARE: 901...1818

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr.7

```
CATACTGGGT GTGGTACTGT AGGGAACCTG CAGATGCTCT GCCGAAGGTC TGCAAATAGT    60
CCCTGGAGTT TGGTAGTAAA GAGTACCAAC TCGTAAAAGT AGTATGTCCA ACCAATTTGA   120
AAGTACAAAC TTTTAGTTTG ATTGATTAAA ATACTTTTGG TGTGTACAGT GACAGCCAAA   180
ATATCATCTC TTCAGCCGAT AGATGTCAAC TGCCCGCCGA AAGTACCGGA AGGTCGTGGT   240
GTTTTAAGGT GAAACACTAT CAGGGCGGCA ATGTGTCAAA GTAGAACCAG TTTGCTTAGC   300
```

```
GCCATTAGGG TCCACGCCTA GACCCCTCGA TGCCCGGGAG TCATCCGTCC TGTCACAGCA      360

ATTATTTCCC CGAGTCTACT GCCGAAGAAG AGCTATTGTG GCGTAATCAT GGAATTACCC      420

TCTGTGTAGG GTAGTCTTGA ACGCCGTTCT AGACACGGCA ACGTTCCGGT GGACGATCGT      480

TTCTGGCTAA TGTACTCCGT AGTTTAGGCA GCTAGCTGAT CATCTTCCCC CTAGGGAAAG      540

GACCTGAATA GTGCGCCAAA ATGAGCTTGA GCAAAGGAAT GTTCTTTCTA AGCCAAAGTG      600

GGGGAAATAA CCAAGCAGCC CACTTTTATC CGAAACGTTT CTGGTGTCAT CCAATATGGA      660

TAAATCCCGA TTGTTCTTCT GCACGTATCA GTATTGCCAT CAACGTAACT ACATATATTT      720

GAACATGGTC TGGTCCTCCG TTCGATTTAT TCGTTCTCCG TGGCCAACGA CTTCAGCCAT      780

TGATCTCTTT TGTTTCTTTC CTGCGGCTAA ACCCATTCGA AG ATG AAG TTC TTC          834
                                              Met Lys Phe Phe
                                                 -25

AAA GCC AAA GGC AGC TTG CTG TCA TCA GGC ATC TAC CTC ATT GCA TTA         882
Lys Ala Lys Gly Ser Leu Leu Ser Ser Gly Ile Tyr Leu Ile Ala Leu
        -20                 -15                 -10

ACC CCC TTT GTC AAC GCC AAA TGT GCT CTT CCG TCG TCC TAT AGT TGG         930
Thr Pro Phe Val Asn Ala Lys Cys Ala Leu Pro Ser Ser Tyr Ser Trp
    -5                  1                   5                  10

AGT TCA ACC GAT GCT CTC GCA ACT CCA AAG TCA GGA TGG ACC GCA CTG         978
Ser Ser Thr Asp Ala Leu Ala Thr Pro Lys Ser Gly Trp Thr Ala Leu
                15                  20                  25

AAG GAC TTT ACT GAT GTT GTC TCG GAC GGC AAA CAT ATT GTC TAT GCG        1026
Lys Asp Phe Thr Asp Val Val Ser Asp Gly Lys His Ile Val Tyr Ala
            30                  35                  40

TCC ACT ACT GAT GAA GCG GGA AAC TAT GGC TCG ATG ACC TTT GGC GCC        1074
Ser Thr Thr Asp Glu Ala Gly Asn Tyr Gly Ser Met Thr Phe Gly Ala
        45                  50                  55

TTC TCA GAG TGG TCG AAC ATG GCA TCC GCT AGC CAG ACA GCC ACC CCC        1122
Phe Ser Glu Trp Ser Asn Met Ala Ser Ala Ser Gln Thr Ala Thr Pro
    60                  65                  70

TTC AAT GCC GTG GCT CCT ACC CTG TTC TAC TTC AAG CCG AAA AGT ATC        1170
Phe Asn Ala Val Ala Pro Thr Leu Phe Tyr Phe Lys Pro Lys Ser Ile
 75                  80                  85                  90

TGG GTT CTG GCC TAC CAA TGG GGC TCC AGC ACA TTC ACC TAC CGC ACC        1218
Trp Val Leu Ala Tyr Gln Trp Gly Ser Ser Thr Phe Thr Tyr Arg Thr
                95                  100                 105

TCC CAA GAT CCC ACC AAT GTC AAT GGC TGG TCG TCG GAG CAG GCG CTT        1266
Ser Gln Asp Pro Thr Asn Val Asn Gly Trp Ser Ser Glu Gln Ala Leu
            110                 115                 120

TTC ACC GGC AAA ATC AGC GAC TCA AGC ACC AAT GCC ATT GAC CAG ACG        1314
Phe Thr Gly Lys Ile Ser Asp Ser Ser Thr Asn Ala Ile Asp Gln Thr
        125                 130                 135

GTG ATT GGC GAT GAT ACG AAT ATG TAT CTC TTC TTC GCC GGC GAC AAC        1362
Val Ile Gly Asp Asp Thr Asn Met Tyr Leu Phe Phe Ala Gly Asp Asn
    140                 145                 150

GGC AAG ATC TAC CGA TCC AGC ATG TCC ATC AAT GAC TTC CCC GGA AGC        1410
Gly Lys Ile Tyr Arg Ser Ser Met Ser Ile Asn Asp Phe Pro Gly Ser
155                 160                 165                 170
```

```
                                                                        1458
    TTC GGC AGC CAG TAC GAG GTG ATC CTG AGT GGC GCC CGC AAC GAT CTA
    Phe Gly Ser Gln Tyr Glu Val Ile Leu Ser Gly Ala Arg Asn Asp Leu
                    175                 180                 185

                                                                        1506
    TTC GAG GCG GTC CAA GTA TAC ACC GTC GAC GGC GGT GAG GGC GAC ACG
    Phe Glu Ala Val Gln Val Tyr Thr Val Asp Gly Gly Glu Gly Asp Thr
            190                 195                 200

                                                                        1554
    AAG TAT CTC ATG ATC GTT GAG GCG ATC GGG TCC ACC GGA CAT CGT TAT
    Lys Tyr Leu Met Ile Val Glu Ala Ile Gly Ser Thr Gly His Arg Tyr
        205                 210                 215

                                                                        1602
    TTC CGC TCC TTC ACG GCC AGC AGT CTG GGT GGA GAG TGG ACA GCC CAG
    Phe Arg Ser Phe Thr Ala Ser Ser Leu Gly Gly Glu Trp Thr Ala Gln
    220                 225                 230

                                                                        1650
    GCG GCA AGT GAG GAT CAA CCC TTC GCA GGC AAA GCC AAC AGT GGT GCC
    Ala Ala Ser Glu Asp Gln Pro Phe Ala Gly Lys Ala Asn Ser Gly Ala
    235                 240                 245                 250

                                                                        1698
    ACC TGG ACC GAA GAC ATT AGC CAT GGT GAC TTG GTT CGC AAC AAC CCT
    Thr Trp Thr Glu Asp Ile Ser His Gly Asp Leu Val Arg Asn Asn Pro
                255                 260                 265

                                                                        1746
    GAT CAA ACG ATG ACT GTC GAT CCT TGC AAC CTC CAG TTG CTC TAT CAG
    Asp Gln Thr Met Thr Val Asp Pro Cys Asn Leu Gln Leu Leu Tyr Gln
            270                 275                 280

                                                                        1794
    GGC CAT GAC CCC AAC AGC AGT GGC GAC TAC AAC CTC TTG CCG TGG AAG
    Gly His Asp Pro Asn Ser Ser Gly Asp Tyr Asn Leu Leu Pro Trp Lys
        285                 290                 295

                                                                        1848
    CCG GGC GTC CTT ACC TTG AAG CAG TGAAGGTATT ATAATTAGTT GCAGATTGTG
    Pro Gly Val Leu Thr Leu Lys Gln
    300                 305

    TTTTCATTCC TTCTTCAAGA GTGCTTAGTG GTGGAAGACA GCAGAAGGTG GTCACTATCT   1908

    TAGGCTCAGT TGGGGTGGGC TTGTGTCCAT AGGCTAGTAA TGTGCGCATA ATTCAGTTCA   1968

    TTGGCAAGGA GTGCGGTATA AATACCTGTT CTCACAAAAA AAAATAGGCC CGGTGGTCAT   2028

    ACTCCGTATT GGGATAGAGA TCTCGTAGTA GTAGGATTGT GGGCCTCAGA GGATGACCGA   2088

    CACGTGAGCA GTCTCCTTCT ACGGCTAGTC GCGTTCTACA TAAGAAATAG TCAGCTCAGA   2148

    GTTTGTTTTT TGGCTACTTT GAAGGATGGC CTATCGAATC GCACGTCTCC TCAATTGGCC   2208

    AGGTATTGGC ATTCACTCTC CGCGCTTTGC GGGTGCCGGC ACGAGATGTC TCCTGGAGAA   2268

    ACTGGGCAAC GAGCAGACTA CGGATATGGG AGATTGTTGA CGACGTTCTT CTTGGTAAAT   2328

    TTGAACCCTT CAGGGGCTCT ATAAAGGCGG AAATCTAAAT CTCATGTGCC CTAACGTGTC   2388

    CGACCACGGT GTTGATCAGC ACCTATTAGA TCAGACAACA ACCTTTGGCT CGGAAATTGA   2448

    ACAGGTAGCT CTTGAATGAC ACTCTGGATC CTGATTCAAT TTATAATGCG TCACTTGAGC   2508

    GTGCAAGGGG TGCTATATTC ACATCTTGCC CCAATCCAAG GGGCGTCGGA TCCCATTGTG   2568

    CTCGACAGCC TGGAACTTCG CCGACAGTAT TCTTACGACG TCGATACTGA AATAGTCCAC   2628

    CTGGTGTGCA TTCGTACGCC GGAAAGACCC TCGTCCGACC GCGTGGCCTT GATTCTGACG   2688

    AGATGCTTCA ACAAGCGGCC AATTCGATGC CAGCTGTTCA TCGGTTAGAT GTGCTACACA   2748

    GTGACCTGAT TCCAGGAAAC ATATTCTGGA ACGAAGGAAA TGGCCGCGTC AATTTTCATT   2808

    GACTTTGAGT GTGCAATAAC CCAAAATAAC GAAATAATGA ACGACCGCTG T            2859
```

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 8

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 332 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: proteină

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr. 8

```
Met Lys Phe Phe Lys Ala Lys Gly Ser Leu Leu Ser Ser Gly Ile Tyr
-25                 -20                 -15

Leu Ile Ala Leu Thr Pro Phe Val Asn Ala Lys Cys Ala Leu Pro Ser
-10                 -5                  1                   5

Ser Tyr Ser Trp Ser Ser Thr Asp Ala Leu Ala Thr Pro Lys Ser Gly
                10                  15                  20

Trp Thr Ala Leu Lys Asp Phe Thr Asp Val Val Ser Asp Gly Lys His
            25                  30                  35

Ile Val Tyr Ala Ser Thr Thr Asp Glu Ala Gly Asn Tyr Gly Ser Met
        40                  45                  50

Thr Phe Gly Ala Phe Ser Glu Trp Ser Asn Met Ala Ser Ala Ser Gln
    55                  60                  65                  70

Thr Ala Thr Pro Phe Asn Ala Val Ala Pro Thr Leu Phe Tyr Phe Lys
                75                  80                  85

Pro Lys Ser Ile Trp Val Leu Ala Tyr Gln Trp Gly Ser Ser Thr Phe
            90                  95                  100

Thr Tyr Arg Thr Ser Gln Asp Pro Thr Asn Val Asn Gly Trp Ser Ser
        105                 110                 115

Glu Gln Ala Leu Phe Thr Gly Lys Ile Ser Asp Ser Ser Thr Asn Ala
    120                 125                 130

Ile Asp Gln Thr Val Ile Gly Asp Asp Thr Asn Met Tyr Leu Phe Phe
135                 140                 145                 150

Ala Gly Asp Asn Gly Lys Ile Tyr Arg Ser Ser Met Ser Ile Asn Asp
                155                 160                 165

Phe Pro Gly Ser Phe Gly Ser Gln Tyr Glu Val Ile Leu Ser Gly Ala
            170                 175                 180

Arg Asn Asp Leu Phe Glu Ala Val Gln Val Tyr Thr Val Asp Gly Gly
        185                 190                 195

Glu Gly Asp Thr Lys Tyr Leu Met Ile Val Glu Ala Ile Gly Ser Thr
    200                 205                 210

Gly His Arg Tyr Phe Arg Ser Phe Thr Ala Ser Ser Leu Gly Gly Glu
215                 220                 225                 230

Trp Thr Ala Gln Ala Ala Ser Glu Asp Gln Pro Phe Ala Gly Lys Ala
                235                 240                 245

Asn Ser Gly Ala Thr Trp Thr Glu Asp Ile Ser His Gly Asp Leu Val
            250                 255                 260

Arg Asn Asn Pro Asp Gln Thr Met Thr Val Asp Pro Cys Asn Leu Gln
        265                 270                 275

Leu Leu Tyr Gln Gly His Asp Pro Asn Ser Ser Gly Asp Tyr Asn Leu
    280                 285                 290

Leu Pro Trp Lys Pro Gly Val Leu Thr Leu Lys Gln
295                 300                 305
```

Președintele comisiei de examinare: **biochim. Crețu Adina**

Examinator: **ing. Eremia Laura**

(51) Int.Cl.[7] C 12 N 15/55;
C 12 N 9/24;
A 21 D 8/04;
D 21 C 3/00;
C 12 R 1:55;

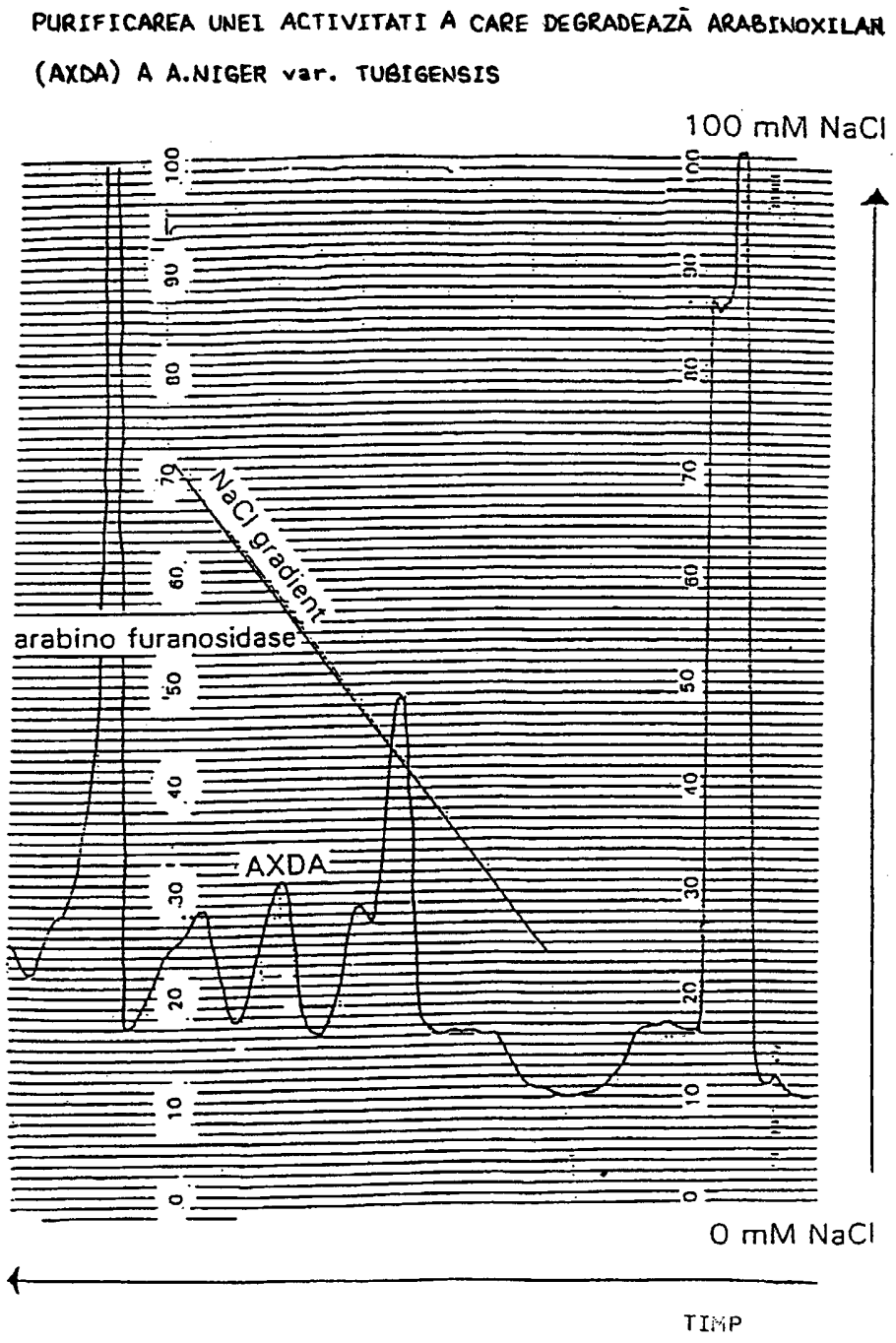


Fig. 1

(51) Int.Cl.[7] C 12 N 15/55;
C 12 N 9/24;
A 21 D 8/04;
D 21 C 3/00;
C 12 R 1:55;

pH OPTIM AL ACTIVITATII A CARE DEGRADEAZĂ ARABINOXILAN (AXDA) AL A. NIGER var. TUBIGENSIS

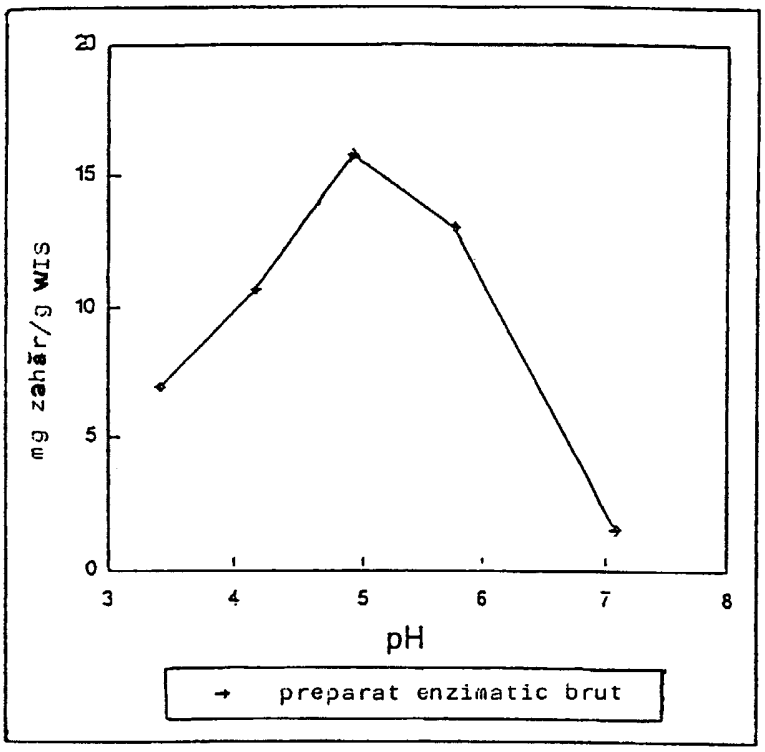


Fig. 2

(51) Int.Cl.[7] C 12 N 15/55;
C 12 N 9/24;
A 21 D 8/04;
D 21 C 3/00;
C 12 R 1:55;

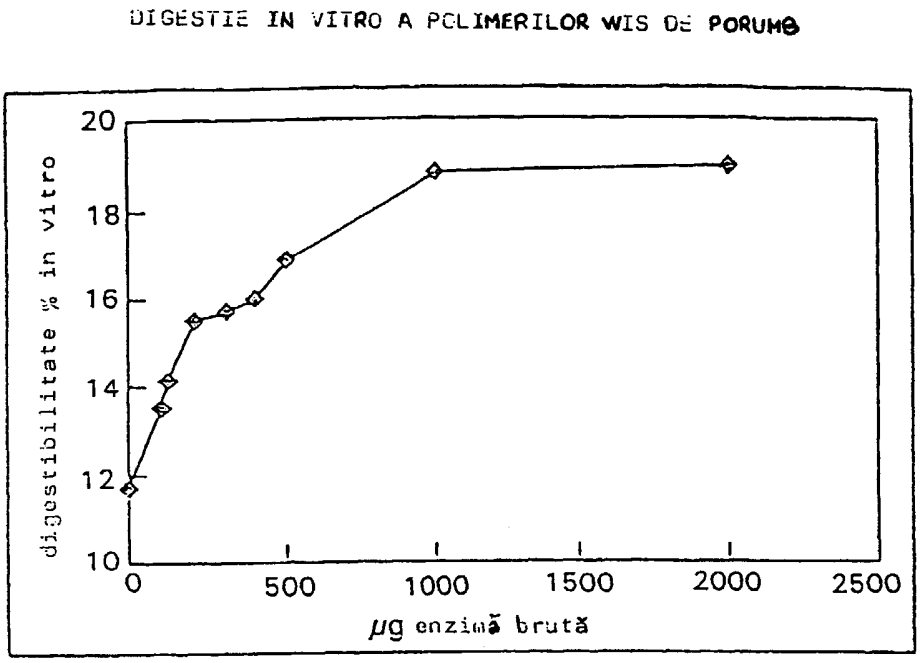


Fig. 3

(51) Int.Cl.[7] C 12 N 15/55;
C 12 N 9/24;
A 21 D 8/04;
D 21 C 3/00;
C 12 R 1:55;

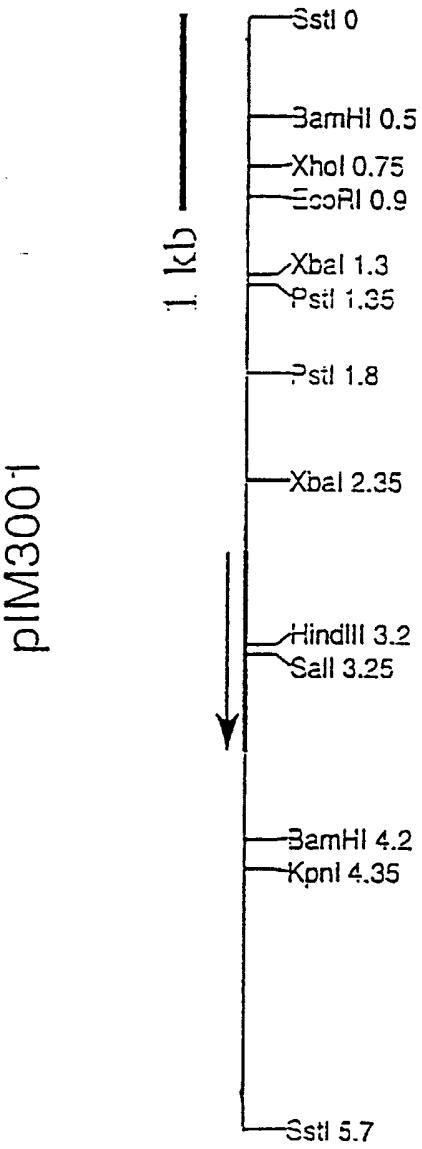


Fig. 4

(51) Int.Cl.[7] C 12 N 15/55;
C 12 N 9/24;
A 21 D 8/04;
D 21 C 3/00;
C 12 R 1:55;

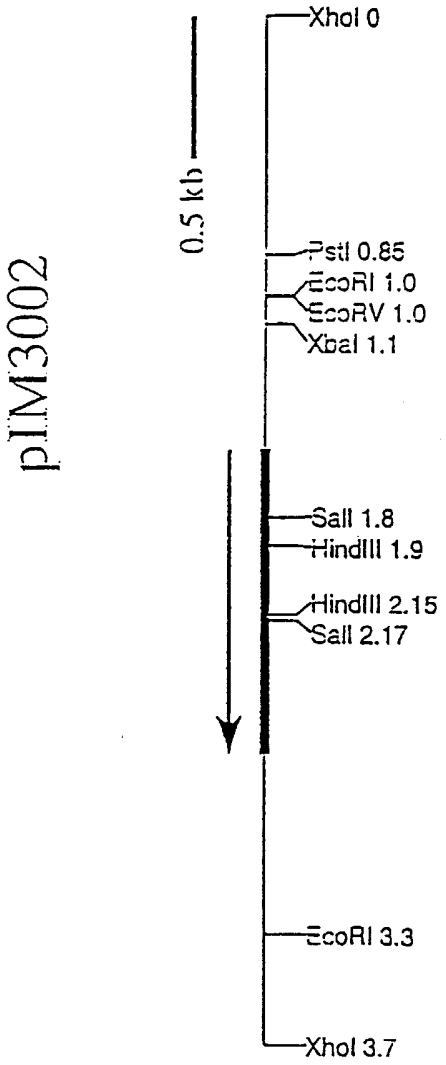


Fig. 5

Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci