

ROYAUME DE BELGIQUE

BREVET D'INVENTION



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1008570A3

NUMERO DE DEPOT : 09400706

Classif. Internat. : C12N A23L D21C

Date de délivrance le : 04 Juin 1996

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 26 Juillet 1994 à 11H25 à l'Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : SOLVAY (Société Anonyme)
rue du Prince Albert 33, B-1050 BRUXELLES(BELGIQUE)

représenté(e)(s) par : MEYERS Liliane, SOLVAY - Département Prop. Indus., Rue de Ransbeek, 310 - 1120 BRUXELLES.

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : XYLANASE, MICROORGANISMES LA PRODUISANT, MOLECULE D'ADN, PROCEDES DE PREPARATION DE CETTE XYLANASE ET UTILISATIONS DE CELLE-CI.

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeurs(s).

Bruxelles, le 04 Juin 1996
PAR DELEGATION SPECIALE :



**L. WUYTS
CONSEILLER**

Xylanase, microorganismes la produisant, molécule d'ADN, procédés
de préparation de cette xylanase et utilisations de celle-ci

L'invention concerne une nouvelle xylanase. L'invention concerne également une nouvelle souche de microorganismes produisant cette xylanase et une molécule d'ADN comprenant la séquence de nucléotides qui code pour cette xylanase.

5 L'invention concerne également les procédés de préparation de cette xylanase, les utilisations de celle-ci et les compositions comprenant celle-ci.

Des xylanases thermostables, actives dans une large gamme de pH sont connues, telles que notamment la xylanase produite par
10 une souche de *Bacillus alcalophilus*, (Gupta, et al. BIOTECHNOLOGY LETTERS, 1992, 14 (11), pages 1045-1046). Cependant, malgré ces propriétés, ces enzymes sembleraient peu efficaces en blanchiment de pâte à papier.

En conséquence, il y a actuellement un besoin pour une
15 xylanase utilisable lors du traitement de la pâte à papier, très stable et également très active dans une large gamme de température et de pH basique et acide.

La présente invention a pour but de fournir une nouvelle xylanase, active dans une large gamme de pH, aussi bien à pH
20 alcalin qu'à pH acide.

La présente invention a également pour but d'identifier, isoler et fournir une souche, en particulier une souche de *Bacillus*, qui produit naturellement ladite xylanase.

La présente invention a également pour but d'isoler et de
25 fournir une molécule d'ADN comprenant une séquence de nucléotides qui code pour ladite xylanase.

La présente invention a également pour but de préparer et fournir un vecteur d'expression et un vecteur d'intégration chromosomique contenant la séquence de nucléotides codant pour
30 ladite xylanase.

La présente invention a également pour but de préparer et

fournir un hôte de *Bacillus* transformé avec le vecteur d'expression ou le vecteur d'intégration contenant la molécule d'ADN comprenant la séquence de nucléotides de la souche de *Bacillus* codant pour ladite xylanase.

5 La présente invention a également pour but de préparer et fournir une composition contenant cette xylanase.

La présente invention a également pour but de préparer et fournir une xylanase utilisable dans le traitement de la pâte à papier, et notamment des pâtes ayant un pH basique, et des pâtes
10 à papier de diverses provenances, telles que les pâtes provenant d'arbres résineux, les pâtes provenant d'arbres feuillus, et particulièrement la pâte d'eucalyptus.

A cet effet, l'invention concerne une xylanase provenant d'un *Bacillus*, et plus particulièrement d'un microorganisme
15 aérobic et non thermophile. On utilise de préférence la souche de *Bacillus* sp. 720/1 ou un dérivé ou mutant de cette souche. La xylanase de l'invention est dérivée de la souche de *Bacillus* sp. 720/1. La xylanase est classifiée dans le système international sous le numéro E.C. 3.2.1.8. Il s'agit d'une endo-1,4-xylanase.

20 De préférence la xylanase, isolée et purifiée, est constituée d'un seul type de polypeptide, ayant un poids moléculaire d'environ 25 kDa.

L'invention concerne une xylanase, isolée et purifiée, comprenant la séquence d'acides aminés de 1 à 221 acides aminés
25 (SEQ ID NO:1) ou une séquence modifiée dérivée de celle-ci. La séquence d'acides aminés et la séquence de nucléotides (SEQ ID NO:2) codant pour la xylanase mature, ainsi que sa traduction en acides aminés (SEQ ID NO:3), est donnée à la figure 1 (figures 1a et 1b).

30 La xylanase de l'invention est synthétisée sous forme d'un précurseur. Le précurseur contient 248 acides aminés (SEQ ID NO:4). On identifie la séquence de nucléotides (SEQ ID NO:5) codant pour le précurseur de la xylanase, ainsi que sa traduction en acides aminés (SEQ ID NO:6).

35 Le précurseur contient la séquence de 221 acides aminés (SEQ ID NO:1) de la xylanase mature et la séquence de 27 acides

aminés (SEQ ID NO:7) de la préséquence; décrite ci-après.

Ceci a pour conséquence que la séquence de la xylanase mature est précédée d'une préséquence. Il s'agit d'une séquence additionnelle de 27 acides aminés (SEQ ID NO:7). On identifie la

5 séquence de nucléotides correspondante (SEQ ID NO:8). Cette séquence de nucléotides, ainsi que sa traduction en acides aminés (SEQ ID NO:9), est illustrée à la figure 2 (figures 2a et 2b).

De manière particulièrement préférée, ladite xylanase a un point isoélectrique déterminé compris entre environ 9,5 et

10 environ 9,7.

La xylanase selon l'invention est thermostable et active dans une large gamme de pH.

La xylanase selon l'invention possède par ailleurs toutes les propriétés adéquates compatibles avec les conditions indus-

15 trielles réelles de traitement enzymatique de la pâte à papier. Selon les multiples étapes des divers traitements de la pâte à papier mis en oeuvre industriellement, ces propriétés sont une bonne stabilité vis-à-vis du pH et de la température, une

20 activité enzymatique dans une large gamme de pH et de température, tels que notamment un pH compris entre environ 5 et 9,5 et une température comprise entre environ 50 et 80 °C.

L'invention concerne également une xylanase modifiée, c'est-à-dire une enzyme dont la séquence en acides aminés diffère de celle de l'enzyme sauvage par au moins un acide aminé. Ces

25 modifications peuvent être obtenues par des techniques classiques de mutagenèse sur l'ADN, telles que l'exposition à des rayonnements ultraviolets, à des produits chimiques, tels que l'éthyl méthane sulfonate (EMS), le N-méthyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), le nitrite de sodium ou l'O-méthylhydroxylamine ou par

30 des techniques de génie génétique, comme, par exemple, la mutagenèse dirigée ou la mutagenèse aléatoire. Ces techniques sont connues de l'homme du métier et sont notamment décrites dans MOLECULAR CLONING - a laboratory manual - SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS - second edition, 1989, chapitre 15.

35 La présente invention concerne également l'identification et la fourniture d'une nouvelle bactérie, isolée et purifiée,

aérobie produisant la xylanase. Généralement elle appartient à la famille de Bacillaceae. De préférence elle appartient au genre Bacillus. De manière particulièrement préférée, ledit Bacillus est la souche de Bacillus sp. 720/1 ou un dérivé ou mutant de cette souche.

Par dérivé ou mutant de cette souche, on entend toute bactérie modifiée naturellement ou artificiellement. Les dérivés de cette souche peuvent être obtenus par les techniques connues de modification telles que rayonnement ultraviolet, rayons X, agents mutagènes ou génie génétique. Ces techniques sont connues de l'homme du métier et sont notamment décrites dans SAMBROOK et al., 1989, chapitre 15.

La souche de Bacillus sp. 720/1 a été déposée à la collection nommée BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS (LMG culture collection, Université de Gand, Laboratoire de Microbiologie - K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gand, Belgique) conformément au Traité de Budapest sous le numéro LMG P-14798 le 9 juin 1994. L'invention concerne une culture isolée et purifiée de la souche de Bacillus sp. 720/1 et une culture dérivée ou mutée de celle-ci.

La souche de la présente invention a été identifiée par ses caractéristiques biochimiques : bactérie Gram positif, aérobie, qui se présente sous la forme de bâtonnet, elle forme une endospore. Elle est oligosporogène.

L'invention concerne également l'isolement et la fourniture d'une molécule d'ADN comprenant la séquence de nucléotides (SEQ ID N0:2) qui code pour la xylanase mature de Bacillus sp. 720/1 (LMG P-14798) ou une séquence modifiée dérivée de celle-ci. De préférence cette molécule d'ADN comprend tout le gène de la xylanase de Bacillus sp. 720/1. Par tout le gène de la xylanase (SEQ ID N0:10), on entend au moins le (ou les) promoteur(s) de transcription, la (ou les) séquence(s) signal, la séquence de nucléotides codant pour la xylanase mature et le (ou les) terminateur(s) de transcription.

La séquence complète de nucléotides codant pour la xylanase mature, ainsi que sa traduction en acides aminés (SEQ ID N0:3),

est donnée à la figure 1 (figures 1a et 1b).

Habituellement, la molécule d'ADN, selon l'invention, comprend au moins la séquence de nucléotides (SEQ ID NO:5) qui code pour le précurseur de la xylanase ou une séquence modifiée dérivée de celle-ci. Cette séquence de nucléotides (SEQ ID NO:5) comprend la séquence de nucléotides (SEQ ID NO:2) codant pour la xylanase mature de *Bacillus* sp. 720/1 (LMG P-14798) et sa séquence signal (préséquence) (SEQ ID NO:8). De préférence, cette molécule d'ADN comprend tout le gène de la xylanase de *Bacillus* sp. 720/1 et, de manière particulièrement préférée, la séquence de nucléotides (SEQ ID NO:10). La séquence de nucléotides (SEQ ID NO:10) est constituée de, dans le sens amino-carboxy et de gauche à droite, la séquence de nucléotides (SEQ ID NO:11) qui comprend le promoteur de la xylanase, la séquence de nucléotides de la préséquence (SEQ ID NO:8), la séquence de nucléotides de la xylanase mature (SEQ ID NO:2) et la séquence de nucléotides (SEQ ID NO:12) qui comprend le terminateur de la xylanase. La figure 2 (figure 2a et figure 2b) représente la séquence de nucléotides du gène codant pour la xylanase ainsi que sa traduction en acides aminés (SEQ ID NO:13).

L'invention concerne également une xylanase mutée obtenue par modification de la séquence de nucléotides du gène qui code pour la xylanase définie ci-dessus. Les techniques d'obtention de telles xylanases mutées sont connues de l'homme du métier et sont notamment décrites dans MOLECULAR CLONING - a laboratory manual - SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS - second edition, 1989, chapitre 15.

La présente invention concerne également un vecteur d'expression ou vecteur d'intégration chromosomique contenant une molécule d'ADN, telle que définie ci-dessus. Habituellement, le vecteur d'expression ou le vecteur d'intégration chromosomique contient une molécule d'ADN qui comprend le gène qui code pour la xylanase ou une séquence modifiée dérivée de celle-ci. De préférence le vecteur d'expression ou le vecteur d'intégration chromosomique contient la molécule d'ADN qui comprend la séquence de nucléotides (SEQ ID NO:10) qui code pour la xylanase de *Bacillus* sp. 720/1 ou une séquence modifiée dérivée de celle-ci.

La présente invention concerne également des souches recombinantes dans lesquelles le gène codant pour la xylanase est introduit par les techniques de génie génétique. Le gène peut être introduit sur un plasmide par un vecteur d'expression ou
5 intégré dans le chromosome de l'hôte en une ou plusieurs copies par un vecteur d'intégration chromosomique.

L'invention concerne également les souches de micro-organismes différentes de l'organisme producteur de départ, dans lesquelles les nucléotides codant pour la xylanase sont
10 introduits par transformation, soit sous forme intégrée dans l'ADN chromosomique, soit sous forme autorépliquative (plasmide).

L'invention concerne la souche transformée de *Bacillus* comprenant la molécule d'ADN qui contient le gène de structure qui code pour la xylanase mature de *Bacillus* sp. 720/1. De
15 préférence, la souche transformée de *Bacillus* est une souche de *Bacillus licheniformis* ou une souche de *Bacillus* sp. 720/1.

L'invention concerne la souche transformée de *Bacillus* comprenant le vecteur d'expression ou le vecteur d'intégration chromosomique qui comprend cette molécule d'ADN. De préférence,
20 la souche transformée de *Bacillus* est une souche de *Bacillus licheniformis*. De préférence, également, la souche transformée de *Bacillus* est une souche de *Bacillus* sp. 720/1.

La présente invention concerne également la xylanase produite par une souche transformée telle que définie ci-dessus.
25

La présente invention concerne également un procédé pour la production d'une xylanase comprenant la culture d'une bactérie aérobique capable de produire la xylanase dans un milieu nutritif approprié contenant des sources de carbone et d'azote et des sels minéraux sous condition d'aérobiose et la récolte de la xylanase
30 ainsi obtenue. Ce milieu de culture peut être solide ou liquide. De préférence le milieu de culture est liquide. De préférence la bactérie aérobique est une souche de *Bacillus* ou un dérivé de cette souche capable de produire la xylanase.

La présente invention concerne également un procédé pour la
35 production d'une xylanase comprenant la culture de la souche de *Bacillus* sp. 720/1 ou un dérivé de cette souche capable de

produire la xylanase dans un milieu nutritif approprié contenant des sources de carbone et d'azote et des sels minéraux sous condition d'aérobiose et la récolte de la xylanase ainsi obtenue.

5 L'invention concerne également un procédé pour la préparation d'une xylanase à partir d'un organisme recombinant, le procédé comprenant l'isolement d'un fragment d'ADN codant pour la xylanase, l'insertion de ce fragment d'ADN dans un vecteur approprié, l'introduction de ce vecteur dans un hôte approprié ou l'introduction de ce fragment d'ADN dans le chromosome d'un hôte
10 approprié, la culture de cet hôte, l'expression de la xylanase et la récolte de la xylanase. L'hôte approprié est choisi généralement parmi le groupe constitué des microorganismes *Escherichia coli*, *Bacillus* ou *Aspergillus*. Habituellement, l'hôte est choisi parmi les *Bacillus*. De préférence, l'hôte est choisi parmi les
15 microorganismes du genre *Bacillus* (aérobies). De manière particulièrement préférée, l'hôte est choisi parmi les microorganismes *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amyloliquefaciens* ou *Bacillus* sp. 720/1.

20 De bons résultats ont été obtenus lorsque l'hôte pour l'expression de la xylanase selon la présente invention est une souche recombinante dérivée de *Bacillus licheniformis*, et de préférence la souche de *Bacillus licheniformis* SE2 delap1. La souche de *Bacillus licheniformis* SE2 delap1 est décrite dans la
25 demande de brevet européen 0 605 040.

L'invention concerne également une xylanase produite, de façon hétérologue, par un microorganisme du genre *Bacillus*. Habituellement, le microorganisme du genre *Bacillus* contient un gène codant pour une protéase alcaline lorsqu'il est à l'état
30 sauvage. De préférence ce microorganisme est une souche de *Bacillus licheniformis* comprenant la molécule d'ADN qui comprend la séquence de nucléotides qui code pour la xylanase de *Bacillus* sp. 720/1. De manière particulièrement préférée, le gène codant pour la protéase alcaline a été enlevé par délétion de cette
35 souche de *Bacillus*. Cette souche est de préférence la souche de *Bacillus licheniformis* SE2 delap1.

Par produite de façon hétérologue, on entend une production qui n'est pas effectuée par le microorganisme naturel, c'est-à-dire le microorganisme qui contient à l'état sauvage le gène qui code pour la xylanase.

5 Les conditions de culture de ces bactéries telles que composants du milieu nutritif, paramètres de culture, température, pH, aération, agitation, sont bien connues de l'homme du métier.

10 Les techniques de récolte de la xylanase sont bien connues de l'homme du métier et sont choisies selon les utilisations envisagées de la xylanase. Habituellement, on emploie la centrifugation, la filtration, l'ultrafiltration, l'évaporation, la microfiltration, la cristallisation ou une combinaison de l'une ou l'autre de ces techniques telle qu'une centrifugation suivie
15 d'une ultrafiltration.

La xylanase peut ensuite être purifiée, si nécessaire et selon les utilisations envisagées. Les techniques de purification d'enzymes sont bien connues de l'homme du métier, telles que la précipitation à l'aide d'un sel, tel que le sulfate d'ammonium,
20 ou de solvant, tel que l'acétone ou un alcool.

La xylanase peut également être séchée par atomisation ou lyophilisation.

La présente invention concerne également des compositions enzymatiques comprenant la xylanase selon l'invention et au moins
25 un additif. Ces additifs sont connus de l'homme du métier et sont choisis selon l'utilisation envisagée de la composition. Ils doivent être compatibles avec la xylanase et ne pas affecter l'activité enzymatique de la xylanase. Habituellement, ces additifs sont des stabilisants de l'enzyme, des agents de conservation et des agents de formulation.
30

Les compositions comprenant la xylanase de la présente invention peuvent être utilisées sous forme solide ou liquide.

La xylanase est formulée selon les utilisations prévues. Des stabilisants ou des agents de conservation peuvent également
35 être ajoutés aux compositions enzymatiques comprenant la xylanase selon l'invention. Par exemple on peut stabiliser la xylanase

par l'addition de propylène glycol, d'éthylène glycol, de glycérol, d'amidon, de xylane, d'un sucre tel que du glucose et du sorbitol, d'un sel tel que du chlorure de sodium, du chlorure de calcium, du sorbate de potassium et du benzoate de sodium ou
5 d'un mélange de deux ou plusieurs de ces produits. De bons résultats ont été obtenus avec du propylène glycol. De bons résultats ont été obtenus avec du sorbitol.

La xylanase selon l'invention a des débouchés multiples dans diverses industries, telles que, par exemples, les industries
10 alimentaires, les industries pharmaceutiques ou les industries chimiques.

La xylanase peut notamment être utilisée en boulangerie. Un exemple d'une utilisation d'une xylanase en boulangerie est, en particulier, décrit dans la demande de brevet international
15 WO 94/04664.

La xylanase peut notamment être utilisée pour le traitement de la pâte à papier. La xylanase de la présente invention est notamment efficace sur la pâte venant du bois d'eucalyptus.

La xylanase peut notamment être utilisée en alimentation
20 animale. Un exemple d'une utilisation d'une xylanase en alimentation animale est, en particulier, décrit dans la demande de brevet européen 0507723.

La figure 1 (figure 1a et figure 1b) représente la séquence de nucléotides (SEQ ID N0:3) codant pour la xylanase mature ainsi
25 que sa traduction en acides aminés.

La figure 2 (figure 2a et figure 2b) représente la séquence de nucléotides (SEQ ID N0:13) du gène codant pour la xylanase ainsi que sa traduction en acides aminés.

La figure 3 représente la carte de restriction du plasmide
30 pUBR2002.

La figure 4 représente la carte de restriction du plasmide pUBR-720X1.

La figure 5 représente la carte de restriction du plasmide pUBR-720X11.

35 La signification des abréviations et symboles utilisés dans ces figures est rassemblée dans le tableau suivant.

Symbole Abréviation	Signification
OriEC	origine de répllication dans E. coli
REP	protéine nécessaire pour la répllication
Ori+	origine de répllication du brin +
Ori-	origine de répllication du brin -
AmpR	gène apportant la résistance à l'ampicilline
KmR	gène apportant la résistance à la kanamycine
BlmR	gène apportant la résistance à la bléomycine
5'720XYL	séquence 5' située en amont de la séquence codant pour la xylanase
3'720XYL	séquence 3' située en aval de la séquence codant pour la xylanase
720XYL	séquence codant pour la xylanase de Bacillus sp. 720/1

La présente invention est illustrée par les exemples suivants.

Exemple 1

Isolement et caractérisation de la souche de Bacillus sp. 720/1

5 La souche de Bacillus sp. 720/1 a été isolée d'un échantillon de sol, prélevé en Argentine, sur un milieu nutritif gélosé et sélectionnée pour sa capacité de dégrader un dérivé coloré du xylane connu sous le nom de l'AZCL-xylane et vendu par la Société MEGAZYME.

10 Cette souche a été mise en culture à 37 °C dans le milieu de croissance LBS/C dont la composition est la suivante : son de blé 10 g/l, TRYPTONE (DIFCO) 10 g/l, extrait de levure 5 g/l, NaCl 10 g/l, Na₂CO₃ 5,3 g/l, NaHCO₃ 4,2 g/l.

15 Le carbonate et le bicarbonate de sodium sont stérilisés séparément, puis ajoutés aseptiquement aux autres composants du milieu stérile. Le milieu gélosé contient en outre 20 g/l d'agar.

La souche de la présente invention a été identifiée par ses caractéristiques biochimiques : bactérie Gram positif, aérobie

qui se présente sous le forme de bâtonnet, elle forme une endospore. Elle appartient donc au genre *Bacillus*.

Les cellules végétatives de cette souche en culture sur le milieu LBS/C gélosé à 37 °C ont une forme de bacille de taille 0,8 x 3,0-5 µm. La mobilité des cellules végétatives est positive.

Après une croissance de 13 jours à 37 °C sur le milieu TSA gélosé, l'observation microscopique révèle la présence de sporanges. Le milieu TSA gélosé contient 15 g/l de TRYPTONE (DIFCO), 5 g/l de peptone de soja; 5 g/l de NaCl et 15 g/l de gélose.

La souche est oligosporogène.

Le test de la catalase est positif en présence de 10 % (v/v) de peroxyde d'hydrogène. Le test de l'oxydase est positif en présence de 1 % (p/v) de tétraméthyl-1,4-phénylène-diammonium-dichlorure.

Cette souche est aérobique, c'est-à-dire qu'elle se développe en aérobiose. Elle ne se développe pas en anaérobiose, c'est-à-dire sous une atmosphère de 84 % (v/v) N₂, 8 % (v/v) CO₂, 8 % (v/v) H₂ à 37 °C. L'abréviation % (v/v) représente un pourcentage exprimé en volume par volume.

Cette souche n'est pas thermophile. Elle présente un développement normal après incubation en milieu LBS/C gélosé à 20 °C, 30 °C, 37 °C et 45 °C, par contre elle ne se développe pas à 50 °C et 55 °C, ni à 10 °C.

Elle présente un développement normal après incubation en milieu LBS/C gélosé en présence de NaCl aux concentrations de 2,0 % (p/v) et de 3,5 % (p/v), présente un développement faible en présence de 5,0 % (p/v) et de 7,0 % (p/v) de NaCl. L'abréviation % (p/v) représente un pourcentage exprimé en poids par volume.

La souche de *Bacillus* sp. 720/1 n'acidifie pas le glucose.

La souche de *Bacillus* sp. 720/1 a été identifiée au moyen de la galerie API 50 CHB et de la galerie API 20 E en suivant les instructions d'utilisation du fournisseur (API SYSTEM, France). La souche de *Bacillus* sp. 720/1 utilise le glycérol, le

N-acétylglucosamine, l'arbutine, le citrate, la galactose, l'amygdaline, le melibiose et hydrolyse la gélatine. Ces caractéristiques différencient nettement la souche de *Bacillus* sp. 720/1 d'une souche de *Bacillus pumilus*. En effet, une souche

5 de *Bacillus pumilus* ne présente aucune de ces caractéristiques.

La souche de *Bacillus* sp. 720/1 a également été identifiée au moyen du système BIOLOG (USA). La banque de données analysant les résultats de ce système donne un score de 0,564 pour le *Bacillus coagulans*, de 0,097 pour le *Bacillus subtilis*, de 0,057

10 pour le *Bacillus licheniformis* et de 0,00 pour le *Bacillus pumilus*. Ces caractéristiques différencient nettement la souche de *Bacillus* sp. 720/1 d'une souche de *Bacillus coagulans*, d'une souche de *Bacillus subtilis*, d'une souche de *Bacillus licheniformis* et d'une souche de *Bacillus pumilus*.

15 La bactérie isolée appartient donc au genre *Bacillus*, aucune espèce connue n'a pu être déterminée.

La souche de *Bacillus* sp. 720/1 a été déposée à la collection nommée BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS (LMG culture collection) sous le numéro

20 LMG P-14798.

Exemple 2

Production de la xylanase par le *Bacillus* sp. 720/1

La souche de *Bacillus* sp. 720/1 est mise en culture sur boîte de Pétri contenant un milieu LBS/C, gélosé, à 37 °C durant

25 48 heures (culture A).

Puis, à partir de la culture A, on réalise une culture dans un milieu LB/C liquide dont la composition est identique à celle du milieu LBS/C mais sans son de blé, à 37 °C durant 24 heures sous agitation orbitale à raison de 250 révolutions par minute

30 (culture B) avec une amplitude d'environ 2,54 cm.

500 ml de la culture B sont ensuite transférés dans un fermenteur de 20 l contenant 14 l de milieu LBS/C. Le pH est laissé libre, la vitesse d'agitation et le débit d'air insufflé dans le fermenteur sont tels que la pression partielle en oxygène

35 dissous dans le milieu de culture ne soit pas inférieur à 30 % de la saturation.

Après 72 heures de culture à 37 °C, on sépare la xylanase et la biomasse cellulaire par centrifugation (BECKMAN J21, rotor JA10) à 8 000 tours par minute pendant 30 minutes. La xylanase produite par la souche de *Bacillus* sp. 720/1 est extracellulaire.

5 Puis on sépare les matières insolubles résiduelles de la xylanase, à partir du surnageant de centrifugation, par micro-filtration (cartouche KROS FLOII 0,2 µ de porosité, Société MICROGON).

10 On lave le rétentat de microfiltration avec 1 l d'eau déminéralisée. On effectue ce lavage trois fois.

 Ensuite, on concentre, environ 20 fois, le perméat de cette microfiltration par ultrafiltration sur une cartouche PALL MICROZA SIP 1013 en polysulfone, ayant un seuil de coupure de 6 kD (Société PALL).

15 On mesure l'activité enzymatique sur le rétentat (produit R) et sur le perméat (produit P) d'ultrafiltration obtenus.

 Une unité enzymatique de la xylanase (IU) est définie comme la quantité d'enzyme qui, à un pH de 8,0, à une température de 50 °C et en présence de xylane, catalyse la libération
20 d'équivalents glucose à raison de 1 µmole de glucose par minute (µM/minute).

 La mesure de l'activité enzymatique xylanase est réalisée selon le protocole décrit par BAILEY, BIELY et POUTANEN, J. BIOTECHNOLOGY, 1992, 23, pages 257-270; à l'exception que le
25 tampon citrate-phosphate cité par BAILEY et al. a été remplacé par le tampon Tris(hydroxyméthylaminoéthane)-HCl, 50 mM (pH de 8,0).

 On ajoute au rétentat d'ultrafiltration (produit R) suffisamment de polyéthylène glycol (polyéthylène glycol de MERCK
30 référence 807490) pour obtenir une concentration de 40 % (p/p). Après solubilisation du polyéthylène glycol, on incube la solution obtenue 30 minutes à 25 °C.

 Puis, on centrifuge la solution, contenant le polyéthylène glycol et la xylanase, 10 minutes à 8 000 tours par minute
35 (centrifugeuse BECKMAN J21, rotor JA10). On élimine le surnageant de centrifugation. On ajoute au culot de centrifugation

suffisamment d'une solution de NaCl (0,9 % v/v) pour retrouver le volume initial du rétentat mis en oeuvre (produit R).

5 Ensuite, on ajoute à cette suspension contenant la xylanase et du NaCl suffisamment d'acétone pour arriver à une concentration de 40 % (v/v). On incube cette suspension acétonique durant 45 minutes à 4 °C.

Après cette incubation, on centrifuge cette suspension acétonique 10 minutes à 8 000 tours par minute (BECKMAN J21, rotor JA10).

10 On conserve le surnageant de centrifugation. A ce surnageant de centrifugation, on ajoute de l'acétone à une concentration de 80 % (v/v). On incube cette suspension acétonique 45 minutes à 4 °C.

15 Après cette incubation, on centrifuge cette suspension acétonique 10 minutes à 8 000 tours par minute (BECKMAN J21, rotor JA10).

On conserve le culot de centrifugation. Celui-ci est mis en suspension dans un volume suffisant d'une solution de NaCl 0,9 % (v/v) pour être solubilisé (produit N).

20 Exemple 3

Purification de la xylanase

25 Une fraction du rétentat d'ultrafiltration (produit N) obtenu à l'exemple 2, est conditionnée par passage sur colonne de chromatographie de perméation sur gel (colonne BIO-RAD ECONOPAC 10DG) équilibrée avec un tampon Bis-Tris (bis(2-hydroxyéthyl)-imino-tris(hydroxyméthyl)méthane) 20mM, pH 6,2 (tampon A). On obtient ainsi une solution nommée produit X.

30 1 ml de la solution produit X est alors déposé sur une colonne échangeuse de cation S SEPHAROSE HP 16/10 (PHARMACIA) préalablement équilibré avec le tampon A. Le débit est de 2,5 ml par minute, avec une élution isocratique pendant 10 minutes, suivie d'un gradient de concentration en NaCl (de 10 à 50 minutes, la teneur en NaCl passe de 0 à 0,7 M). Un pic unique est détecté pendant le gradient, correspondant à l'élution de la
35 xylanase.

On recueille les fractions contenant l'activité xylanase

(solution A).

On vérifie que ces fractions contiennent de la xylanase en déposant 10 µl de chaque fraction sur un milieu gélosé comprenant du xylane (milieu contenant 0,5 g/l d'AZCL-xylane, tampon TRIS
5 50 mM (pH = 8,0) et 15 g/l d'agar). Un halo se forme autour des fractions qui contiennent de la xylanase.

Exemple 4

Séquence d'acides aminés

La séquence d'acides aminés de la xylanase de la présente
10 invention est indirectement déterminée à partir de la séquence de nucléotides (SEQ ID NO:10) du gène qui code pour cette xylanase, dont l'obtention est décrite à l'exemple 14. Ceci est réalisé à l'aide du programme d'ordinateur IntelliGenetics Suite Software for Molecular Biology (Release #5.4) d'IntelliGenetics, Inc. USA.

15 La figure 2 (figure 2a et figure 2b) représente la séquence de nucléotides (SEQ ID NO:10) du gène codant pour la xylanase ainsi que sa traduction en acides aminés (SEQ ID NO:13).

La xylanase est synthétisée sous forme d'un précurseur. Le précurseur de la xylanase contient 248 acides aminés (SEQ ID
20 NO:4). On identifie la séquence de nucléotides (SEQ ID NO:5) codant pour le précurseur de la xylanase ainsi que sa traduction en acides aminés (SEQ ID NO:6).

On identifie la préséquence de la xylanase synthétisée sous forme d'un précurseur. Il s'agit d'une séquence de 27 acides
25 aminés (SEQ ID NO:7). On identifie la séquence de nucléotides correspondante (SEQ ID NO:8).

Ensuite, on identifie la séquence en acides aminés de la xylanase mature. La xylanase mature contient 221 acides aminés (SEQ ID NO:1).

30 La figure 1 (figure 1a et figure 1b) représente la séquence de nucléotides (SEQ ID NO:2) codant pour la xylanase mature ainsi que sa traduction en acides aminés (SEQ ID NO:3).

Exemple 5

Distribution en acides aminés

35 La distribution en acides aminés de la xylanase mature, déterminée à partir de la séquence en acides aminés (SEQ ID NO:1)

de la xylanase (exemple 4), est résumée dans le tableau 1.

TABLEAU 1

Symbole	Acides aminés	Nombre	% (en poids moléculaire)
N	asparagine	25	11,6
Y	tyrosine	13	8,6
T	thréonine	18	7,4
S	serine	19	6,7
I	isoleucine	14	6,4
V	valine	14	5,6
G	glycine	24	5,5
W	tryptophane	7	5,3
K	lysine	10	5,2
R	arginine	8	5,1
Q	glutamine	9	4,7
D	acide aspartique	10	4,7
L	leucine	10	4,6
E	acide glutamique	8	4,2
F	phénylalanine	7	4,2
P	proline	7	2,8
M	méthionine	5	2,7
A	alanine	8	2,3
H	histidine	4	2,2
C	cystéine	1	0,4
B	acide aspartique/ asparagine	0	0,0
X	inconnu	0	0,0
Z	glutamine acide glutamique	0	0,0

Exemple 6

Estimation du poids moléculaire

On estime, par calcul, le poids moléculaire de la xylanase à partir de la séquence en acides aminés de la forme mature de la

xylanase, comme décrit à l'exemple 4.

On déduit par calcul un poids moléculaire de 24698,61 Daltons.

Exemple 7

5 Détermination du poids moléculaire

On effectue sur la solution A contenant la xylanase, telle qu'obtenue à l'exemple 3, une concentration sur un dispositif CENTRICON 10 kD (AMICON).

100 µl de la solution concentrée sont déposés sur une
10 colonne de chromatographie de perméation sur gel SUPERDEX 75 HR 10/30 (PHARMACIA). La colonne a été préalablement calibrée au moyen des marqueurs de poids moléculaire (PHARMACIA) GEL FILTRATION LMW calibration kit code 17-0442-01. L'élution a lieu
15 à 0,25 ml/minute au moyen d'un tampon CAPSO (acide 3-(cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propane sulfonique) 25mM, pH 9,2 additionné de NaCl 0,2M.

Le chromatogramme obtenu montre un pic unique correspondant à l'activité xylanase. On en déduit un poids moléculaire apparent de la protéine d'environ 13,5 kD.

20 On effectue également sur la fraction issue de ce pic unique une électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Le système de gel utilisé est le système PHASTSYSTEM de PHARMACIA LKB BIOTECHNOLOGY, avec des gels contenant un gradient de polyacrylamide de 10-15 % (v/v). Les
25 conditions d'électrophorèse sont celles prescrites par le fournisseur. On utilise comme témoin les marqueurs de poids moléculaire PHARMACIA LMW (Low Molecular Weight), référence 17-0446-01. Les marqueurs mis en oeuvre sont la phosphorylase b (94 kD), l'albumine (67 kD), l'ovalbumine (43 kD), la carboanhydrase (30 kD), l'inhibiteur de la trypsine (20,1 kD) et
30 l'alpha-lactalbumine (14,4 kD).

Une coloration au bleu de Coomassie fait apparaître un polypeptide d'un poids moléculaire d'environ 25,7 kD.

Exemple 8

35 Estimation du point isoélectrique

On estime le point isoélectrique de la xylanase à partir de

la séquence en acides aminés de la forme mature de la xylanase, comme décrit à l'exemple 4.

Le point isoélectrique estimé tient compte de tous les acides aminés présents dans la protéine, comme si cette protéine
5 était dénaturée.

On déduit un point isoélectrique de 7,46 pour la xylanase, sous sa forme dénaturée.

Exemple 9

Détermination du point isoélectrique

10 On dépose une fraction de la solution A, telle qu'obtenue à l'exemple 3, sur une colonne de chromatofocalisation MONO P 5/20 (PHARMACIA) en suivant les recommandations du fournisseur, et préalablement équilibrée avec un tampon diéthanolamine 25 mM, pH 9,9.

15 La colonne est éluée au moyen de la solution d'ampholytes POLYBUFFER 96 (PHARMACIA) diluée 10 fois dans l'eau déminéralisée.

Le pH de la fraction contenant l'activité xylanase est de 9,5.

20 On vérifie que cette fraction contient la xylanase en déposant 10 µl de celle-ci sur un milieu gélosé comprenant du xylane (milieu contenant 0,5 g/l d'AZCL-xylane, tampon TRIS 50 mM (pH = 8,0) et 15 g/l d'agar). Un halo, qui se présente sous la forme d'une zone d'hydrolyse de l'AZCL-xylane, se forme autour de
25 la fraction qui contient la xylanase.

On réalise sur une fraction de la solution A, telle qu'obtenue à l'exemple 3, une focalisation isoélectrique.

Pour réaliser cela, on réhydrate le gel PHARMACIA DRYIEF par un mélange constitué de 2 ml d'eau déminéralisée, de 150 µl de
30 produit BIOLYTE 8-10 (BIORAD) et de 75 µl de produit PHARMALYTE 8-10,5 (PHARMACIA). On dépose environ 200 nanogrammes de protéines (fraction de la solution A) sur le gel. On suit le protocole décrit par le fournisseur.

35 On en déduit que la xylanase a un point isoélectrique légèrement supérieur à 9,6, point isoélectrique du marqueur le plus élevé mis en oeuvre.

Le point isoélectrique observé expérimentalement est représentatif de la charge de surface de la protéine sous sa forme native.

Exemple 10

5 Profil d'activité en fonction du pH pour la xylanase produite par la souche naturelle (Bacillus sp. 720/1)

On mesure, selon la méthode décrite à l'exemple 2, l'activité enzymatique de la xylanase en présence de xylane, à une température de 50 °C et à différents pH (de 5,6 à 10,35) dans
10 différents tampons choisis pour obtenir le pH souhaité. On met en oeuvre la solution de xylanase, telle qu'obtenue à l'exemple 2 (produit N).

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 2.

15 Au cours de cet essai l'activité enzymatique maximale a été mesurée pour l'échantillon placé à un pH d'environ 6,2 et à une température d'environ 50 °C durant 15 minutes. Par définition on a donc attribué à cet échantillon une activité enzymatique relative de 100 %.

20 Cet exemple montre que la xylanase selon l'invention développe une activité enzymatique de plus de 70 % de l'activité enzymatique maximale dans une gamme de pH compris entre environ 5,6 et environ 9,5.

TABLEAU 2

pH	Tampon utilisé (50 mM)	Activité relative %
5,6	Tris-maléate	85
6,2	Tris-maléate	100
6,8	Tris-maléate	96
7,5	Tris-maléate/Tris *	88
8,7	Tris/Capso *	92
9,5	Capso/Caps *	76
10	Caps	50
10,35	Caps	19

Tris = tris(hydroxyméthyl)aminométhane

Tris-maléate = tampon formé de tris(hydroxyméthyl)aminométhane (50 mM) et d'acide maléique (50 mM) dont la proportion entre les composants est choisie en fonction du pH souhaité, le pH étant ajusté au moyen de NaOH (1 M).

Capso = acide 3-(cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propane sulfonique

Caps = acide 3-(cyclohexylamino)-1-propane sulfonique

Le symbole * signifie que la valeur obtenue est la moyenne des mesures effectuées au même pH mais obtenues avec les deux tampons.

Exemple 11

Effet du pH sur l'activité de la xylanase produite par la souche de Bacillus sp. 720/1 en aide au blanchiment de la pâte de résineux

On prépare trois suspensions aqueuses d'une pâte de pin (en provenance de la société SCA) ayant 2,5 % (en poids de matière sèche) de consistance et ayant un indice Kappa initial de 17.

On ajuste le pH de ces suspensions à pH 5 avec H₂SO₄.

1^{re} étape : étape à l'enzyme (étape X)

On dilue la solution nommée produit N, telle qu'obtenue à l'exemple 2, avec de l'eau déminéralisée pour obtenir une solution d'enzyme ayant une activité enzymatique de 25 UI/ml

(comme décrit à l'exemple 2).

On ajoute cette solution d'enzyme, contenant la xylanase, à une suspension de pâte de pin de telle sorte que la suspension de pâte soit traitée au moyen de 5 UI/g de pâte sèche

- 5 Aux deux autres suspensions de pâte de pin, on ajoute de l'eau déminéralisée à la place de la solution d'enzyme dans des proportions identiques.

Puis on incube les trois suspensions pendant 2 heures à 50 °C sans agitation.

- 10 2e étape : étape au chlore (étape C)

Ensuite, chaque suspension de pâte, ainsi obtenue, est soumise à un traitement de blanchiment qui consiste en une chloration avec de l'eau chlorée. Ce traitement a lieu sur une pâte ayant une consistance de 3 % en poids de matière sèche.

- 15 Pour cela, on ajoute à la suspension de pâte traitée enzymatiquement et à une suspension de pâte non traitée enzymatiquement une quantité de chlore de 2,89 (= 0,17 x 17) % (poids/poids de pâte sèche). On ajoute à l'autre suspension de pâte non traitée enzymatiquement une quantité de chlore de 3,40
20 (0,20 x 17) % (poids/poids).

On incube les 3 suspensions pendant 1 heure à température ambiante. Puis, on lave la pâte avec 40 volumes d'eau déminéralisée.

3e étape : étape à la soude (étape E)

- 25 Ensuite, on effectue une extraction alcaline qui consiste à ajouter 2 % (poids/poids de pâte sèche) de NaOH aux trois suspensions obtenues ci-dessus et qui ont une consistance de 5 % en poids de matière sèche.

- 30 On incube les trois suspensions pendant 1 heure 30 à une température de 60 °C. Puis, on lave la pâte avec 40 volumes d'eau déminéralisée et on la récupère sous forme de feuille à une blancheur d'environ 45 ° ISO (+/- 3 ° ISO).

On mesure l'indice Kappa des trois feuilles obtenues.

- 35 L'indice Kappa est relatif à la mesure de la quantité de lignine présente dans la pâte. L'indice Kappa est un nombre qui représente le volume (en millilitre) d'une solution de perman

ganate de potassium 0,1 N (KMnO_4) consommé par un gramme de pâte sèche dans les conditions spécifiées et en suivant les procédures décrites dans la norme TAPPI (Technical Committee of the Association of the Pulp and Paper industry) #T236cm-85 (1985).

5 Le degré ISO est relatif à la mesure de brillance du papier obtenu à partir de la pâte. Cette valeur est un facteur de la réflectance du papier obtenu à partir de la pâte dans les conditions spécifiées et en suivant les procédures décrites dans la norme ISO (The International Organization for Standardization) #2469 publiée dans la norme #ISO 2470-1977 (F) en complément de
10 la norme #2470.

On réalise quatre essais identiques à l'exception de la mise à pH initiale à pH 5. En effet, on réalise quatre essais avec une suspension aqueuse de pâte de pin dont le pH a été ajusté respectivement à pH 6, à pH 7, à pH 8, à pH 9 au lieu de pH 5.
15

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 3.

TABEAU 3

Quantité d'enzymes mises en oeuvre (UI/g)	5	0	0
Quantité de chlore mis en oeuvre (% en poids/poids de pâte sèche)	2,89	2,89	3,40
pH initial	Indice Kappa		
5	4,63	5,01	4,18
6	3,81	/	4,11
7	3,81	5,01	4,06
8	3,55	/	4,21
9	3,71	4,91	4,07

Le symbole / signifie que la suspension de pâte n'a pas été

testée.

Ces résultats montrent que la xylanase selon l'invention permet une réduction d'environ 15 à 20 % de la quantité de chlore pour une pâte blanchie à 45 ° ISO. De plus, ces résultats sont
5 obtenus aussi bien à un pH alcalin qu'à un pH acide. Ces bons résultats sont également obtenus à un pH d'environ 9.

Cet exemple montre que la xylanase selon l'invention présente une activité dans une large gamme de pH. En effet, la xylanase selon l'invention est active dans une gamme de pH
10 compris entre environ 5 et environ 10. Elle est particulièrement active pour des valeurs de pH supérieures ou égales à environ 6. Elle est particulièrement active pour des valeurs de pH inférieures ou égales à environ 9.

Exemple 12

15 Effet de la température sur l'activité de la xylanase produite par la souche de Bacillus sp. 720/1 en aide au blanchiment de la pâte de résineux

On reproduit l'exemple 11 avec 5 suspensions de pâte de résineux à pH 8. L'étape de traitement enzymatique est réalisée à
20 un pH de 8 et à différentes températures (55, 60 et 65 °C).

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 4.

TABLEAU 4

Quantité d'enzymes mises en oeuvre (UI/g)	5	0	0
Quantité de chlore mis en oeuvre (% en poids/poids de pâte sèche)	2,89	2,89	3,40
Température °C	Indice Kappa		
55	3,89	/	/
60	3,64	4,77	4,09
65	3,49	/	/

Le symbole / signifie que la suspension de pâte n'a pas été testée.

On observe que la pâte est blanchie à environ 45 ° ISO.

5 Ces résultats montrent que l'indice Kappa des échantillons de pâte traitée enzymatiquement reste largement inférieur à l'indice de l'échantillon non traité enzymatiquement.

Cet exemple montre que la xylanase selon l'invention est active dans une large gamme de température. Elle est active à une température d'environ 65 °C.

10 Cet exemple montre également que la xylanase selon l'invention est stable à une température d'environ 60 °C.

Exemple 13

Activité de la xylanase produite par la souche de Bacillus sp. 720/1 en aide au blanchiment de la pâte d'eucalyptus dans la
15 séquence ECF

Pour cet exemple, on met en oeuvre une pâte d'eucalyptus venant de la société CEASA MILL (Espagne). La pâte est traitée en suivant une séquence ECF ("Elemental Chlorine Free"), c'est-à-dire que la succession d'étapes constituant la séquence

ne fait pas appel à du chlore élémentaire.

1e étape : étape à l'oxygène (étape 0)

La pâte est traitée par un procédé mettant en oeuvre de l'oxygène tel que décrit dans le brevet U.S. 4,462,864, de telle sorte qu'une pâte ayant un indice Kappa initial de 12,3 et un degré ISO initial de 33,4 est obtenue.

Deux suspensions aqueuses sont préparées à partir de cette pâte traitée par l'oxygène ayant une consistance de 4 % en poids de matière sèche.

On ajuste le pH de ces suspensions à pH 9 avec HCl.

2e étape : étape à l'enzyme (étape X)

On dilue la solution nommée produit N, telle qu'obtenue à l'exemple 2, avec de l'eau déminéralisée pour obtenir une solution d'enzyme ayant une activité enzymatique de 25 UI/ml.

On ajoute cette solution d'enzyme, contenant la xylanase, à une suspension de pâte de pin de telle sorte que la suspension de pâte soit traitée au moyen de 10 UI/g de pâte sèche.

Aux deux autres suspensions de pâte de pin, on ajoute de l'eau déminéralisée à la place de la solution d'enzyme.

Puis on incube les 3 suspensions pendant 1 heure 30 minutes à 50 °C sans agitation.

3e étape : étape au dioxyde de chlore (étape D)

Ensuite, chaque suspension de pâte, ainsi obtenue, est soumise à un traitement de blanchiment qui consiste en une chloration avec du dioxyde de chlore. Ce traitement a lieu sur une pâte ayant une consistance de 3 % en poids de matière sèche.

Pour cela, on ajoute à la suspension de pâte traitée enzymatiquement et à une suspension de pâte non traitée enzymatiquement une quantité de dioxyde de chlore de 0,6 % (poids/poids de pâte sèche). On ajoute à l'autre suspension de pâte non traitée enzymatiquement une quantité de dioxyde de chlore de 1 % (poids/poids).

On incube les 3 suspensions pendant 30 minutes à 50 °C. Puis, on lave la pâte avec 40 volumes d'eau déminéralisée.

4e étape : étape à la soude et au peroxyde d'hydrogène (étape E/P)

Ensuite, on effectue une extraction alcaline qui consiste à ajouter 1,8 % (poids/poids de pâte sèche) de NaOH et 0,5 % (poids/poids de pâte sèche) de peroxyde d'hydrogène aux trois suspensions obtenues ci-dessus et qui ont une consistance de 12 % en poids de matière sèche.

On incube les trois suspensions pendant 1 heure 30 à une température de 70 °C. Puis, on lave la pâte avec 40 volumes d'eau déminéralisée.

5e étape : étape au dioxyde de chlore (étape D)

Ensuite, chaque suspension de pâte, ainsi obtenue, est soumise de nouveau à un traitement de blanchiment qui consiste en une chloration avec du dioxyde de chlore. Ce traitement a lieu sur une pâte ayant une consistance de 12 %.

On ajoute à ces trois suspensions une quantité de dioxyde de chlore de 0,5 % (poids/poids de pâte sèche).

On incube les 3 suspensions pendant 2 heures à 75 °C. Puis, on lave la pâte avec 40 volumes d'eau déminéralisée.

6e étape : étape à la soude et au peroxyde d'hydrogène (étape E/P)

Ensuite, on effectue une extraction alcaline qui consiste à ajouter 0,6 % (poids/poids de pâte sèche) de NaOH et 0,3 % (poids/poids de pâte sèche) de peroxyde d'hydrogène aux trois suspensions obtenues ci-dessus et qui ont une consistance de 12 % en poids de matière sèche.

On incube les trois suspensions pendant 1 heure 30 à une température de 70 °C. Puis, on lave la pâte avec 40 volumes d'eau déminéralisée.

7e étape : étape au dioxyde de chlore (étape D)

Ensuite, chaque suspension de pâte, ainsi obtenue, est soumise à un traitement de blanchiment qui consiste en une chloration avec du dioxyde de chlore. Ce traitement a lieu sur une pâte ayant une consistance de 12 %.

On ajoute à ces trois suspensions une quantité de dioxyde de chlore de 0,3 % (poids/poids).

On incube les 3 suspensions pendant 2 heures 30 minutes à 75 °C. Puis, on lave la pâte avec 40 volumes d'eau déminéralisée

et on la récupère sous forme de feuille.

On mesure le degré ISO des trois feuilles obtenues.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 5.

TABLEAU 5

Quantité d'enzymes mises en oeuvre à l'étape 2 en UI/g	10	0	0
Quantité de dioxyde de chlore mis en oeuvre à l'étape 3 en % (poids/poids) de pâte sèche)	0,6	0,6	1,0
° ISO	88,5	85,5	87,9

5 Cet exemple montre que la xylanase selon l'invention est efficace sur la pâte d'eucalyptus. De plus, elle ne nécessite aucun ajustement de pH, puisqu'elle présente l'avantage d'être active au pH de la pâte, c'est-à-dire à un pH d'environ 9.

10 Cet exemple montre également qu'en comparaison de ce qui est obtenu sans xylanase, l'utilisation de la xylanase selon l'invention entraîne une augmentation de la brillance d'au moins 3 ° ISO pour une quantité de ClO₂ fixée.

15 Cet exemple montre également que l'utilisation de la xylanase selon l'invention permet de réduire la quantité de ClO₂ d'environ 4 à 5 kg/tonne de pâte, ce qui représente environ 25 à 30 % de la quantité totale de ClO₂ nécessaire.

Exemple 14

Détermination de la séquence nucléotidique et protéique de la xylanase de Bacillus sp. 720/1

1. Extraction de l'ADN chromosomique à partir de la souche de Bacillus sp. 720/1

20 A partir de la culture B, telle qu'obtenue à l'exemple 2, une culture de 200 ml de la souche de Bacillus sp. 720/1 est réalisée en milieu LB/C durant 16 heures à 37 °C. Le milieu LB/C

est identique au milieu LBS/C, décrit à l'exemple 1, sans l'addition de son de blé.

Lorsque cette culture est réalisée et qu'elle est en phase stationnaire, elle est centrifugée (BECKMAN J 21, rotor JA10) à 5 000 tours par minute pendant 10 minutes. Le culot de centrifugation ainsi obtenu est repris dans 9 ml de tampon TRIS-HCl (tris(hydroxyméthyl)aminométhane acidifié avec HCl 0,1 M), à un pH de 8, EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) 0,1 M, NaCl 0,15 M contenant 18 mg de lysozyme, la suspension ainsi obtenue est incubée 15 minutes à 37 °C.

Le lysat ainsi obtenu est ensuite traité par 200 µl d'une solution de RNase à 10 mg/ml pendant 20 minutes à 50 °C. 1 ml d'une solution de SDS (sodium dodécyl sulfate) à 10 % (p/v) est alors ajoutée à ce lysat. Ensuite on incube ce lysat durant 30 minutes à 70 °C.

Puis le lysat est refroidi aux environs de 45 °C, on y ajoute ensuite 0,5 ml d'une solution de protéinase K (vendue par BOEHRINGER Mannheim) à 20 mg/ml (préparée extemporanément).

Le lysat est incubé à 45 °C sous agitation manuelle jusqu'à l'obtention d'une solution transparente.

On effectue à partir de cette solution transparente plusieurs extractions au phénol sous les conditions et en suivant les procédures décrites dans Molecular Cloning - a laboratory manual - SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS - second edition, 1989, à la page E.3, jusqu'à l'obtention d'une interface propre, comme cela y est décrit.

L'ADN est précipité par 20 ml d'éthanol. Le précipité est récupéré par centrifugation à 5 000 tours par minute (BECKMAN J21, rotor JA10) pendant 5 minutes, puis mis en suspension dans 2 ml de tampon TE à pH 8,0 (10 mM TRIS-HCl, 1mM EDTA à pH 8,0). Cette suspension contient l'ADN chromosomique.

2. Construction du vecteur pUBR2002

Le vecteur pUBR2002 (E. coli - Bacillus subtilis) a été obtenu à partir du plasmide pBR322 qui est vendu par la société BIOLABS (CLONTECH LABORATORIES catalogue n° 6210-1).

On construit deux oligonucléotides synthétiques par la

technique décrite dans BEAUCAGE et al. (1981), Tetrahedron Letters, 22, pages 1859-1882 et en utilisant des β -cyanoéthyl phosphoramidites dans un appareil de BIOSEARCH CYCLONE SYNTHESIZER.

5 Les séquences de ces deux oligonucléotides sont les suivantes :

SEQ ID NO:14

5' - CCCCCCTACGTAGCGGCCGCCCGGCCGTAACCTAGGAAGTCAGCGCCCTGCACC - 3'

et SEQ ID NO:15

5' - CCCCCCTACGTAGGCCGGGGCGGCCGCGTTACCTAGGGCCTCGTGATACGCCTAT - 3'

Ces deux oligonucléotides sont utilisés pour effectuer une amplification par PCR à partir du plasmide pBR322 selon la technique décrite dans Molecular Cloning, a laboratory Manual -
10 SAMBROOK et al., second edition, 1989, pages 14.18-14.19.

Le fragment amplifié par PCR contient le réplicon E. coli limité par les sites de restriction SnaBI.

Le fragment SnaBI-SnaBI d'environ 2,8 kpb (kpb = 1000 paires de bases) est ligaturé avec le vecteur pUB131 (décrit dans la
15 demande de brevet européen 0 415 296) qui a préalablement fait l'objet d'une digestion avec SnaBI.

La technique de la ligation est décrite par SAMBROOK et al (pages 1.68-1.69). Toutes les ligations réalisées dans les exemples de cette demande ont été effectuées en suivant cette
20 technique.

La ligation ainsi obtenue est transformée dans des cellules d'E. coli MC1061 [CLONTECH LABORATORIES, catalogue n° C-1070-1] par électroporation (SAMBROOK et al, pages 1.75-1.81). Les
25 cellules transformées sont mises en culture sur boîte de Pétri contenant le milieu LB gélosé, 100 μ g/ml d'ampicilline et 10 μ g/ml de kanamycine, à 37 °C pendant environ 18 heures.

Après croissance, les colonies isolées sont soumises à une analyse par restriction, analyse décrite dans Molecular Cloning, a laboratory Manual - MANIATIS et al., 1982, Cold Spring Harbor
30 Laboratory, pages 374-379.

On obtient une souche dont on extrait le vecteur qui est dénommé pUBR2002 (figure 3).

3. Construction d'une collection de gènes de Bacillus sp. 720/1

A partir de la suspension le contenant, l'ADN chromosomique est clivé partiellement par l'enzyme de restriction Sau3AI. Les conditions de restriction sont celles décrites par SAMBROOK et al. (pages 5.28-5.32), à part que ces conditions de restriction sont augmentées d'un facteur 10, afin d'obtenir une quantité d'ADN suffisante pour les étapes de purification suivantes.

Le rapport entre la quantité d'ADN mise en oeuvre et la quantité d'enzyme est ajusté afin d'obtenir un maximum de fragments de taille comprise entre 4 et 7 kpb (kpb : 10^3 paires de bases).

L'ensemble des fragments ainsi obtenus est ensuite soumis à une électrophorèse en gel d'agarose (0,8 % p/v), comme décrit par SAMBROOK et al., pages 6.01-6.19, et les fragments de taille comprise entre 4 et 7 kpb sont isolés et purifiés par la méthode de filtration suivie d'une centrifugation décrite dans ZHU et al., Bio/Technology 3, 1985, pages 1014-1016.

Les fragments d'ADN ainsi purifiés sont ensuite ligaturés (selon la méthode décrite par SAMBROOK et al. (pages 1.68-1.69) avec le plasmide pUBR2002 (E. coli - Bacillus subtilis), préalablement coupé au site BamHI et déphosphorylé comme décrit par SAMBROOK et al. (pages 1.60-1.61).

La ligation ainsi obtenue est transformée dans des cellules de E. coli MC1061 par électroporation (SAMBROOK et al., pages 1.75-1.81).

4. Criblage de la collection de gènes

Les cellules transformées de E. coli sont mises en culture sur boîte de Pétri contenant le milieu LB gélosé, 0,8 g/l d'AZCL-xylane et 100 µg/ml d'ampicilline, durant environ 24 heures à 37 °C. On isole une colonie présentant une zone d'hydrolyse.

Le plasmide présent dans cette colonie est extrait et isolé par la technique de la lyse alcaline décrite dans SAMBROOK et al., pages 1.25-1.28.

On effectue une analyse par restriction (SAMBROOK et al., page 1.85). Cette analyse indique que le fragment d'ADN obtenu

qui contient le gène de la xylanase a une taille d'environ 3,5 kpb (kpb = 1 000 paires de bases). Il est porté par le vecteur pUBR2002 qui a été ligaturé.

On obtient ainsi le plasmide pUBR-720X1 (figure 4).

5 5. Clonage d'un fragment chromosomique contenant le gène de la xylanase

Le plasmide pUBR-720X1 est digéré par des enzymes de restriction aux sites SwaI et SpeI. Le gène de la xylanase est ainsi obtenu sur un fragment d'ADN SwaI-SpeI d'environ 1,5 kpb.

10 Ce fragment d'ADN SwaI-SpeI est soumis à un traitement avec le fragment Klenow de l'ADN polymérase (SAMBROOK et al., pages F.2-F.3).

La préparation d'ADN ainsi obtenue est ligaturée avec le vecteur pUBR2002, qui a été préalablement digéré avec EcoRV et déphosphorylé.

15 La ligation est ensuite transformée dans des cellules d'E. coli MC1061 par électroporation.

Les souches transformées sont sélectionnées sur boîte de Pétri contenant le milieu LB (Luria-Bertani) gélosé, 0,8 g/l d'AZCL-xylane (MEGAZYME) et 100 µg/ml d'ampicilline, après 20 croissance à 37 °C pendant environ 24 heures.

Les colonies présentant une zone d'hydrolyse sont isolées. Elles sont soumises à une analyse par la technique de la lyse alcaline (SAMBROOK et al., pages 1.25-1.28).

25 Puis les souches transformées sont soumises à une analyse par restriction (MANIATIS et al., 1982, pages 374-379). Cette analyse par restriction montre que le plasmide isolé, pUBR-720X11 (figure 5), contient le gène de la xylanase sur un fragment d'environ 1,5 kpb de l'ADN chromosomique du Bacillus sp. 720/1.

30 Le plasmide pUBR-720X11 est ensuite utilisé pour transformer les cellules d'E. coli JM109 (CLONTECH LABORATORIES catalogue n° C1005-1) par la technique au CaCl₂ (SAMBROOK et al., pages 1.82-1.84).

35 Les cellules transformées de E. coli sont cultivées sur boîte de Pétri contenant le milieu LB gélosé, 0,8 g/l d'AZCL-xylane et 100 µg/ml d'ampicilline. Après croissance à

37 °C pendant environ 24 heures, on observe une zone d'hydrolyse autour des colonies. Ceci montre que les cellules transformées de *E. coli* expriment bien la xylanase.

5 La technique permettant de déphosphoryler les fragments d'ADN ou de linéariser les vecteurs est décrite par SAMBROOK et al. (pages 1.60-1.61).

On isole une colonie présentant une zone d'hydrolyse. Le plasmide présent dans cette colonie est extrait et isolé par la technique de la lyse alcaline.

10 On établit la séquence de la xylanase à partir de la méthode décrite dans SAMBROOK et al. pages 13.15 et 13.17 (figure 13.3B) en utilisant le plasmide pUBR-720X11 comme matrice.

Pour initier la détermination de la séquence, des oligonucléotides synthétiques sont préparés pour s'hybrider avec le plasmide pUBR2002. Les séquences de ces oligonucléotides synthétiques sont les suivantes :

SEQ ID NO:16

5' - ACGAGGAAAGATGCTGTTCTTGTAATGAGT - 3'

et SEQ ID NO:17

5' - TACCTTGTCTACAAACCCC - 3'

Le reste de la séquence est déterminé par l'utilisation d'autres oligonucléotides synthétiques en se basant sur les parties de la séquence nouvellement déterminées.

20 La séquence de nucléotides du gène complet qui code pour la xylanase (SEQ ID NO:10) est ainsi obtenue (figure 2). Le gène de la xylanase est obtenu comme un fragment d'environ 1,5 kpb.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES :

(i) DEPOSANT :

- (A) NOM : SOLVAY (Société Anonyme)
- (B) RUE : rue du Prince Albert, 33
- (C) VILLE : Bruxelles
- (E) PAYS : Belgique
- (F) CODE POSTAL : 1050
- (G) TELEPHONE : (02) 509.61.11

(ii) TITRE DE L'INVENTION : xylanase, microorganismes la produisant, molécule d'ADN, procédés de préparation de cette xylanase et utilisations de celle-ci

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES : 17

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR :

- (A) TYPE DE SUPPORT : Floppy disk
- (B) ORDINATEUR : IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D'EXPLOITATION : PC-DOS:MS-DOS

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 221 acides aminés
- (B) TYPE : acide aminé
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : protéine

(v) TYPE DE FRAGMENT : fragment interne

(vi) ORIGINE :

- (A) ORGANISME : Bacillus
- (B) SOUCHE : 720/1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:1:

Gln Ile Val Thr Asp Asn Ser Ile Gly Asn His Asp Gly Tyr Asp Tyr
1 5 10 15

Glu Phe Trp Lys Asp Ser Gly Gly Ser Gly Thr Met Ile Leu Asn His
20 25 30

Gly Gly Thr Phe Ser Ala Gln Trp Asn Asn Val Asn Asn Ile Leu Phe
35 40 45

Arg Lys Gly Lys Lys Phe Asn Glu Thr Gln Thr His Gln Gln Val Gly
50 55 60

Asn Met Ser Ile Asn Tyr Gly Ala Asn Phe Gln Pro Asn Gly Asn Ala
 65 70 75 80
 Tyr Leu Cys Val Tyr Gly Trp Thr Val Asp Pro Leu Val Glu Tyr Tyr
 85 90 95
 Ile Val Asp Ser Trp Gly Asn Trp Arg Pro Pro Gly Ala Thr Pro Lys
 100 105 110
 Gly Thr Ile Thr Val Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Leu
 115 120 125
 Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile Lys Gly Ile Ala Thr Phe Lys Gln Tyr
 130 135 140
 Trp Ser Val Arg Arg Ser Lys Arg Thr Ser Gly Thr Ile Ser Val Ser
 145 150 155 160
 Asn His Phe Arg Ala Trp Glu Asn Leu Gly Met Asn Met Gly Lys Met
 165 170 175
 Tyr Glu Val Ala Leu Thr Val Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ala
 180 185 190
 Asn Val Tyr Ser Asn Thr Leu Arg Ile Asn Gly Asn Pro Leu Ser Thr
 195 200 205
 Ile Ser Asn Asp Glu Ser Ile Thr Leu Asp Lys Asn Asn
 210 215 220

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 663 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN génomique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:2:

CAAATCGTCA CCGACAATTC CATTGGCAAC CACGATGGCT ATGATTATGA ATTTTGAAAA 60
 GATAGCGGTG GCTCTGGGAC AATGATTCTC AATCATGGCG GTACGTTTACG TGCCCAATGG 120
 AACAAATGTTA ACAACATATT ATTCCGTAAG GGTAAGAAAAAT TCAATGAAAC ACAAACACAC 180
 CAACAAGTTG GTAACATGTC CATAAACTAC GGAGCCAACT TCCAACCAAA TGTAATGCG 240
 TATTTATGCG TCTATGGTTG GACTGTTGAC CCTCTTGTCTG AATATTATAT TGTCGACAGT 300

TGGGGCAACT GGCCTCCACC AGGAGCAACG CCTAAGGGGA CCATCACTGT TGATGGAGGA	360
ACATATGATA TCTACGAGAC TCTTAGAGTC AATCAACCCT CCATTAAGGG GATTGCCACA	420
TTTAAACAAT ATTGGAGTGT TCGAAGATCG AAACGCACGA GTGGCACGAT TTCTGTCAGC	480
AACCACTTTA GAGCGTGGGA AAACCTAGGG ATGAATATGG GGAAAATGTA TGAAGTCGCG	540
CTTACTGTAG AAGGCTATCA AAGTAGCGGA AGTGCTAATG TATATAGCAA TACTAAGA	600
ATTAACGGTA ACCCTCTCTC AACTATTAGT AATGACGAGA GCATAACTTT GGATAAAAAC	660
AAT	663

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 663 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN génomique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:3:

CAA ATC GTC ACC GAC AAT TCC ATT GGC AAC CAC GAT GGC TAT GAT TAT	48
Gln Ile Val Thr Asp Asn Ser Ile Gly Asn His Asp Gly Tyr Asp Tyr	
1 5 10 15	
GAA TTT TGG AAA GAT AGC GGT GGC TCT GGG ACA ATG ATT CTC AAT CAT	96
Glu Phe Trp Lys Asp Ser Gly Gly Ser Gly Thr Met Ile Leu Asn His	
20 25 30	
GGC GGT ACG TTC AGT GCC CAA TGG AAC AAT GTT AAC AAC ATA TTA TTC	144
Gly Gly Thr Phe Ser Ala Gln Trp Asn Asn Val Asn Asn Ile Leu Phe	
35 40 45	
CGT AAA GGT AAA AAA TTC AAT GAA ACA CAA ACA CAC CAA CAA GTT GGT	192
Arg Lys Gly Lys Lys Phe Asn Glu Thr Gln Thr His Gln Gln Val Gly	
50 55 60	
AAC ATG TCC ATA AAC TAC GGA GCC AAC TTC CAA CCA AAT GGT AAT GCG	240
Asn Met Ser Ile Asn Tyr Gly Ala Asn Phe Gln Pro Asn Gly Asn Ala	
65 70 75 80	
TAT TTA TGC GTC TAT GGT TGG ACT GTT GAC CCT CTT GTC GAA TAT TAT	288
Tyr Leu Cys Val Tyr Gly Trp Thr Val Asp Pro Leu Val Glu Tyr Tyr	
85 90 95	

ATT GTC GAC AGT TGG GGC AAC TGG CGT CCA CCA GGA GCA ACG CCT AAG	336
Ile Val Asp Ser Trp Gly Asn Trp Arg Pro Pro Gly Ala Thr Pro Lys	
100 105 110	
GGG ACC ATC ACT GTT GAT GGA GGA ACA TAT GAT ATC TAC GAG ACT CTT	384
Gly Thr Ile Thr Val Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Leu	
115 120 125	
AGA GTC AAT CAA CCC TCC ATT AAG GGG ATT GCC ACA TTT AAA CAA TAT	432
Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile Lys Gly Ile Ala Thr Phe Lys Gln Tyr	
130 135 140	
TGG AGT GTT CGA AGA TCG AAA CGC ACG AGT GGC ACG ATT TCT GTC AGC	480
Trp Ser Val Arg Arg Ser Lys Arg Thr Ser Gly Thr Ile Ser Val Ser	
145 150 155 160	
AAC CAC TTT AGA GCG TGG GAA AAC TTA GGG ATG AAT ATG GGG AAA ATG	528
Asn His Phe Arg Ala Trp Glu Asn Leu Gly Met Asn Met Gly Lys Met	
165 170 175	
TAT GAA GTC GCG CTT ACT GTA GAA GGC TAT CAA AGT AGC GGA AGT GCT	576
Tyr Glu Val Ala Leu Thr Val Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ala	
180 185 190	
AAT GTA TAT AGC AAT ACA CTA AGA ATT AAC GGT AAC CCT CTC TCA ACT	624
Asn Val Tyr Ser Asn Thr Leu Arg Ile Asn Gly Asn Pro Leu Ser Thr	
195 200 205	
ATT AGT AAT GAC GAG AGC ATA ACT TTG GAT AAA AAC AAT	663
Ile Ser Asn Asp Glu Ser Ile Thr Leu Asp Lys Asn Asn	
210 215 220	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 248 acides aminés
- (B) TYPE : acide aminé
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : protéine

(v) TYPE DE FRAGMENT : fragment interne

(vi) ORIGINE :

- (A) ORGANISME : Bacillus
- (B) SOUCHE : 720/1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:4:

Met Arg Gln Lys Lys Leu Thr Leu Ile Leu Ala Phe Leu Val Cys Phe
-25 -20 -15

Ala Leu Thr Leu Pro Ala Glu Ile Ile Gln Ala Gln Ile Val Thr Asp
 -10 -5 1 5
 Asn Ser Ile Gly Asn His Asp Gly Tyr Asp Tyr Glu Phe Trp Lys Asp
 10 15 20
 Ser Gly Gly Ser Gly Thr Met Ile Leu Asn His Gly Gly Thr Phe Ser
 25 30 35
 Ala Gln Trp Asn Asn Val Asn Asn Ile Leu Phe Arg Lys Gly Lys Lys
 40 45 50
 Phe Asn Glu Thr Gln Thr His Gln Gln Val Gly Asn Met Ser Ile Asn
 55 60 65
 Tyr Gly Ala Asn Phe Gln Pro Asn Gly Asn Ala Tyr Leu Cys Val Tyr
 70 75 80 85
 Gly Trp Thr Val Asp Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Ser Trp
 90 95 100
 Gly Asn Trp Arg Pro Pro Gly Ala Thr Pro Lys Gly Thr Ile Thr Val
 105 110 115
 Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Leu Arg Val Asn Gln Pro
 120 125 130
 Ser Ile Lys Gly Ile Ala Thr Phe Lys Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg
 135 140 145
 Ser Lys Arg Thr Ser Gly Thr Ile Ser Val Ser Asn His Phe Arg Ala
 150 155 160 165
 Trp Glu Asn Leu Gly Met Asn Met Gly Lys Met Tyr Glu Val Ala Leu
 170 175 180
 Thr Val Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ala Asn Val Tyr Ser Asn
 185 190 195
 Thr Leu Arg Ile Asn Gly Asn Pro Leu Ser Thr Ile Ser Asn Asp Glu
 200 205 210
 Ser Ile Thr Leu Asp Lys Asn Asn
 215 220

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 744 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN génomique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:5:

```

ATGAGACAAA AGAAATTGAC GTTGATTTTA GCCTTTTGTAG TTTGTTTTGC ACTAACCTTA      60
CCTGCAGAAA TAATTCAGGC ACAAATCGTC ACCGACAATT CCATTGGCAA CCACGATGGC      120
TATGATTATG AATTTTGGAA AGATAGCGGT GGCTCTGGGA CAATGATTCT CAATCATGGC      180
GGTACGTTCA GTGCCCAATG GAACAATGTT AACAACATAT TATTCGGTAA AGGTAAAAAA      240
TTCAATGAAA CACAAACACA CCAACAAGTT GGTAACATGT CCATAAACTA CGGAGCCAAC      300
TTCCAACCAA ATGGTAATGC GTATTTATGC GTCTATGGTT GGAAGTTGA CCCTCTTGTC      360
GAATATTATA TTGTCGACAG TTGGGGCAAC TGGCGTCCAC CAGGAGCAAC GCCTAAGGGG      420
ACCATCACTG TTGATGGAGG AACATATGAT ATCTACGAGA CTCTTAGAGT CAATCAACCC      480
TCCATTAAGG GGATTGCCAC ATTTAAACAA TATTGGAGTG TTCGAAGATC GAAACGCACG      540
AGTGGCACGA TTTCTGTCAG CAACCACTTT AGAGCGTGGG AAAACTTAGG GATGAATATG      600
GGGAAAATGT ATGAAGTCGC GCTTACTGTA GAAGGCTATC AAAGTAGCGG AAGTGCTAAT      660
GTATATAGCA ATACACTAAG AATTAACGGT AACCCTCTCT CAACTATTAG TAATGACGAG      720
AGCATAACTT TGGATAAAAA CAAT                                          744

```

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
 - (A) LONGUEUR : 744 paires de bases
 - (B) TYPE : acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS : simple
 - (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN génomique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:6:

```

ATG AGA CAA AAG AAA TTG ACG TTG ATT TTA GCC TTT TTA GTT TGT TTT      48
Met Arg Gln Lys Lys Leu Thr Leu Ile Leu Ala Phe Leu Val Cys Phe
      -25                      -20                      -15

GCA CTA ACC TTA CCT GCA GAA ATA ATT CAG GCA CAA ATC GTC ACC GAC      96
Ala Leu Thr Leu Pro Ala Glu Ile Ile Gln Ala Gln Ile Val Thr Asp
      -10                      -5                      1                      5

```

AAT TCC ATT GGC AAC CAC GAT GGC TAT GAT TAT GAA TTT TGG AAA GAT	144
Asn Ser Ile Gly Asn His Asp Gly Tyr Asp Tyr Glu Phe Trp Lys Asp	
10 15 20	
AGC GGT GGC TCT GGG ACA ATG ATT CTC AAT CAT GGC GGT ACG TTC AGT	192
Ser Gly Gly Ser Gly Thr Met Ile Leu Asn His Gly Gly Thr Phe Ser	
25 30 35	
GCC CAA TGG AAC AAT GTT AAC AAC ATA TTA TTC CGT AAA GGT AAA AAA	240
Ala Gln Trp Asn Asn Val Asn Asn Ile Leu Phe Arg Lys Gly Lys Lys	
40 45 50	
TTC AAT GAA ACA CAA ACA CAC CAA CAA GTT GGT AAC ATG TCC ATA AAC	288
Phe Asn Glu Thr Gln Thr His Gln Gln Val Gly Asn Met Ser Ile Asn	
55 60 65	
TAC GGA GCC AAC TTC CAA CCA AAT GGT AAT GCG TAT TTA TGC GTC TAT	336
Tyr Gly Ala Asn Phe Gln Pro Asn Gly Asn Ala Tyr Leu Cys Val Tyr	
70 75 80 85	
GGT TGG ACT GTT GAC CCT CTT GTC GAA TAT TAT ATT GTC GAC AGT TGG	384
Gly Trp Thr Val Asp Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Ser Trp	
90 95 100	
GGC AAC TGG CGT CCA CCA GGA GCA ACG CCT AAG GGG ACC ATC ACT GTT	432
Gly Asn Trp Arg Pro Pro Gly Ala Thr Pro Lys Gly Thr Ile Thr Val	
105 110 115	
GAT GGA GGA ACA TAT GAT ATC TAC GAG ACT CTT AGA GTC AAT CAA CCC	480
Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Leu Arg Val Asn Gln Pro	
120 125 130	
TCC ATT AAG GGG ATT GCC ACA TTT AAA CAA TAT TGG AGT GTT CGA AGA	528
Ser Ile Lys Gly Ile Ala Thr Phe Lys Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg	
135 140 145	
TCG AAA CGC ACG AGT GGC ACG ATT TCT GTC AGC AAC CAC TTT AGA GCG	576
Ser Lys Arg Thr Ser Gly Thr Ile Ser Val Ser Asn His Phe Arg Ala	
150 155 160 165	
TGG GAA AAC TTA GGG ATG AAT ATG GGG AAA ATG TAT GAA GTC GCG CTT	624
Trp Glu Asn Leu Gly Met Asn Met Gly Lys Met Tyr Glu Val Ala Leu	
170 175 180	
ACT GTA GAA GGC TAT CAA AGT AGC GGA AGT GCT AAT GTA TAT AGC AAT	672
Thr Val Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ala Asn Val Tyr Ser Asn	
185 190 195	
ACA CTA AGA ATT AAC GGT AAC CCT CTC TCA ACT ATT AGT AAT GAC GAG	720
Thr Leu Arg Ile Asn Gly Asn Pro Leu Ser Thr Ile Ser Asn Asp Glu	
200 205 210	

AGC ATA ACT TTG GAT AAA AAC AAT
 Ser Ile Thr Leu Asp Lys Asn Asn
 215 220

744

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 27 acides aminés
- (B) TYPE : acide aminé
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(v) TYPE DE FRAGMENT : fragment interne

(vi) ORIGINE :

- (A) ORGANISME : Bacillus
- (B) SOUCHE : 720/1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:7:

Met Arg Gln Lys Lys Leu Thr Leu Ile Leu Ala Phe Leu Val Cys Phe
 -25 -20 -15

Ala Leu Thr Leu Pro Ala Glu Ile Ile Gln Ala
 -10 -5

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 81 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN génomique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:8:

ATGAGACAAA AGAAATTGAC GTTGATTTTA GCCTTTTGTAG TTTGTTTTC ACTAACCTTA 60

CCTGCAGAAA TAATTCAGGC A 81

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 81 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN génomique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:9:

ATG AGA CAA AAG AAA TTG ACG TTG ATT TTA GCC TTT TTA GTT TGT TTT	48
Met Arg Gln Lys Lys Leu Thr Leu Ile Leu Ala Phe Leu Val Cys Phe	
-25 -20 -15	
GCA CTA ACC TTA CCT GCA GAA ATA ATT CAG GCA	81
Ala Leu Thr Leu Pro Ala Glu Ile Ile Gln Ala	
-10 -5	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:10:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
- (A) LONGUEUR : 1513 paires de bases
 - (B) TYPE : acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS : simple
 - (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN génomique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:10:

AAATTGAATT GTGTATATCT AATGATAACG ACAAATCGTC ACTGTTTTTA AACTAATCTC	60
AAACCAATAC TTCTTTATTT AACGCTAACC ACTTGCAATC TTATCACAAG AACATTCTTT	120
ATAGGAACTT TCCCATTTGC AAGACGATAA AAAATCTTTT TCCCCTATTT TATCTTATCG	180
CCTTGATCGG TTTAATTTGT AAACCTTATT TTAGTTTACG TGATGTTCCC TCATTCATAC	240
CATTAATCAC AGTTAACGCT AGAGTCATCT TTTTTCGGTT CTCAAAAATA CCTGAAGAAC	300
ATTTATGTCA TATTTTCTCA CGCCGCTCCA TAATGGAATA TATATACTCT TTTATACATA	360
TTAAGTAAAT TAGTATATAC TTGCGTTATC AAAATGTGAG ATAATCTAAT TGATCAAACA	420
AGCAGCTATC CAAAAACAC TGATGTTGAC CTCTTAAAGA AGTGTCAC TA TCTATGAAAA	480
GATAATTATC CAGTTTCAAA ATTTGAAATA GTGTGTATGG AATAGTTTGA ATGTCAACTG	540
CTGTGAAAGG AGGGTAGGTA GTACCGTAGA CTTTATTACC AAAAATTAGT TGTAACAAAA	600
TTAAAGGAG GAATGCCTAA TGAGACAAAA GAAATTGACG TTGATTTTAG CCTTTTATG	660
TTGTTTTGCA CTAACCTTAC CTGCAGAAAT AATTCAGGCA CAAATCGTCA CCGACAATTC	720
CATTGGCAAC CACGATGGCT ATGATTATGA ATTTTGAAA GATAGCGGTG GCTCTGGGAC	780

AATGATTCTC AATCATGGCG GTACGTTTCAG TGCCCAATGG AACAATGTTA ACAACATATT	840
ATTCCGTAAA GGTAAGAAAT TCAATGAAAC ACAACACAC CAACAAGTTG GTAACATGTC	900
CATAAACTAC GGAGCCAACT TCCAACCAAA TGGTAATGCG TATTTATGCG TCTATGGTTG	960
GAAGTTGAC CCTCTTGTCG AATATTATAT TGTCGACAGT TGGGGCAACT GCGTCCACC	1020
AGGAGCAACG CCTAAGGGGA CCATCACTGT TGATGGAGGA ACATATGATA TCTACGAGAC	1080
TCTTAGAGTC AATCAACCCT CCATTAAGGG GATTGCCACA TTAAACAAT ATTGGAGTGT	1140
TCGAAGATCG AAACGCACGA GTGGCAGGAT TTCTGTCAGC AACCCTTTA GAGCGTGGGA	1200
AACTTAGGG ATGAATATGG GGAAAATGTA TGAAGTCGCG CTTACTGTAG AAGGCTATCA	1260
AAGTAGCGGA AGTGCTAATG TATATAGCAA TACACTAAGA ATTAACGGTA ACCCTCTCTC	1320
AACTATTAGT AATGACGAGA GCATAACTTT GGATAAAAC AATTAAAAAT CCTTATCTCT	1380
TTCCGTTTCAG TTCTCATTAT TTTCAAATAA CCTCCCGGTT GGATCTTTTC CAACGGGAGG	1440
TTTTATTGGA AAGGTTAAGT ATAGTATACT CCGATTCCAT CCAGAGGAAT GCTTGAAACA	1500
CCTCCGTCAC TAG	1513

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 619 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN génomique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:11:

AAATTGAATT GTGTATATCT AATGATAACG ACAAATCGTC ACTGTTTTTA AACTAATCTC	60
AAACCAATAC TTCTTTATTT AACGCTAACC ACTTGCAATC TTATCACAAG AACATTCTTT	120
ATAGGAACTT TCCCATTTGC AAGACGATAA AAAATCTTTT TCCCCTATTT TATCTTATCG	180
CCTTGATCGG TTTAATTTGT AACTTTTATT TTAGTTTACG TGATGTTCCC TCATTTCATAC	240
CATTAATCAC AGTTAACGCT AGAGTCATCT TTTTTCGGTT CTCAAAAATA CCTGAAGAAC	300
ATTTATGTCA TATTTTCTCA CGCCGCTCCA TAATGGAATA TATATACTCT TTTATACATA	360
TTAAGTAAAT TAGTATATAC TTGCGTTATC AAAATGTGAG ATAATCTAAT TGATCAAACA	420

```

AGCAGCTATC CAAAAACAC TGATGTTGAC CTCTTAAAGA AGTGTCATA TCTATGAAAA 480
GATAATTATC CAGTTTCAA ATTTGAAATA GTGTGTATGG AATAGTTTGA ATGTCAACTG 540
CTGTGAAAGG AGGGTAGGTA GTACCGTAGA CTTATTACC AAAAATTAGT TGTAACAAAA 600
TTAAAGGAG GAATGCCTA 619

```

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:12:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
 - (A) LONGUEUR : 150 paires de bases
 - (B) TYPE : acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS : simple
 - (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN génomique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:12:

```

TAAAAATCCT TATCTCTTTC GGTTCAGTTC TCATTATTTT CAAATAACCT CCCGGTTGGA 60
TCTTTTCCAA CGGGAGGTTT TATTGGAAAG GTTAAGTATA GTATACTCCG ATTCCATCCA 120
GAGGAATGCT TGAAACACCT CCGTCACTAG 150

```

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:13:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
 - (A) LONGUEUR : 1513 paires de bases
 - (B) TYPE : acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS : simple
 - (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN génomique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:13:

```

AAATTGAATT GTGTATATCT AATGATAACG ACAAATCGTC ACTGTTTTTA AACTAATCTC 60
AAACCAATAC TTCTTTATTT AACGCTAACC ACTTGCAATC TTATCACAAG AACATTCTTT 120
ATAGGAACCT TCCCATTGTC AAGACGATAA AAAATCTTTT TCCCCTATTT TATCTTATCG 180
CCTTGATCGG TTTAATTTGT AAACCTTTATT TTAGTTTACG TGATGTTCCC TCATTCATAC 240
CATTAAATCAC AGTTAACGCT AGAGTCATCT TTTTTCGGTT CTCAAAAATA CCTGAAGAAC 300
ATTTATGTCA TATTTTCTCA CGCCGCTCCA TAATGGAATA TATATACTCT TTTATACATA 360

```

TTAAGTAAAT TAGTATATAC TTGCGTTATC AAAATGTGAG ATAATCTAAT TGATCAAACA	420
AGCAGCTATC CAAAAAACAC TGATGTTGAC CTCTTAAAGA AGTGTCACCTA TCTATGAAAA	480
GATAATTATC CAGTTTCAAA ATTTGAAATA GTGTGTATGG AATAGTTTGA ATGTCAACTG	540
CTGTGAAAGG AGGGTAGGTA GTACCGTAGA CTTCATTACC AAAAAATTAGT TGTAAAAAAA	600
TTAAAAGGAG GAATGCCTA ATG AGA CAA AAG AAA TTG ACG TTG ATT TTA GCC Met Arg Gln Lys Lys Leu Thr Leu Ile Leu Ala	652
-25 -20	
TTT TTA GTT TGT TTT GCA CTA ACC TTA CCT GCA GAA ATA ATT CAG GCA Phe Leu Val Cys Phe Ala Leu Thr Leu Pro Ala Glu Ile Ile Gln Ala	700
-15 -10 -5	
CAA ATC GTC ACC GAC AAT TCC ATT GGC AAC CAC GAT GGC TAT GAT TAT Gln Ile Val Thr Asp Asn Ser Ile Gly Asn His Asp Gly Tyr Asp Tyr	748
1 5 10 15	
GAA TTT TGG AAA GAT AGC GGT GGC TCT GGG ACA ATG ATT CTC AAT CAT Glu Phe Trp Lys Asp Ser Gly Gly Ser Gly Thr Met Ile Leu Asn His	796
20 25 30	
GGC GGT ACG TTC AGT GCC CAA TGG AAC AAT GTT AAC AAC ATA TTA TTC Gly Gly Thr Phe Ser Ala Gln Trp Asn Asn Val Asn Asn Ile Leu Phe	844
35 40 45	
CGT AAA GGT AAA AAA TTC AAT GAA ACA CAA ACA CAC CAA CAA GTT GGT Arg Lys Gly Lys Lys Phe Asn Glu Thr Gln Thr His Gln Gln Val Gly	892
50 55 60	
AAC ATG TCC ATA AAC TAC GGA GCC AAC TTC CAA CCA AAT GGT AAT GCG Asn Met Ser Ile Asn Tyr Gly Ala Asn Phe Gln Pro Asn Gly Asn Ala	940
65 70 75 80	
TAT TTA TGC GTC TAT GGT TGG ACT GTT GAC CCT CTT GTC GAA TAT TAT Tyr Leu Cys Val Tyr Gly Trp Thr Val Asp Pro Leu Val Glu Tyr Tyr	988
85 90 95	
ATT GTC GAC AGT TGG GGC AAC TGG CGT CCA CCA GGA GCA ACG CCT AAG Ile Val Asp Ser Trp Gly Asn Trp Arg Pro Pro Gly Ala Thr Pro Lys	1036
100 105 110	
GGG ACC ATC ACT GTT GAT GGA GGA ACA TAT GAT ATC TAC GAG ACT CTT Gly Thr Ile Thr Val Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Leu	1084
115 120 125	
AGA GTC AAT CAA CCC TCC ATT AAG GGG ATT GCC ACA TTT AAA CAA TAT Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile Lys Gly Ile Ala Thr Phe Lys Gln Tyr	1132
130 135 140	

TGG AGT GTT CGA AGA TCG AAA CGC ACG AGT GGC ACG ATT TCT GTC AGC	1180
Trp Ser Val Arg Arg Ser Lys Arg Thr Ser Gly Thr Ile Ser Val Ser	
145 150 155 160	
AAC CAC TTT AGA GCG TGG GAA AAC TTA GGG ATG AAT ATG GGG AAA ATG	1228
Asn His Phe Arg Ala Trp Glu Asn Leu Gly Met Asn Met Gly Lys Met	
165 170 175	
TAT GAA GTC GCG CTT ACT GTA GAA GGC TAT CAA AGT AGC GGA AGT GCT	1276
Tyr Glu Val Ala Leu Thr Val Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ala	
180 185 190	
AAT GTA TAT AGC AAT ACA CTA AGA ATT AAC GGT AAC CCT CTC TCA ACT	1324
Asn Val Tyr Ser Asn Thr Leu Arg Ile Asn Gly Asn Pro Leu Ser Thr	
195 200 205	
ATT AGT AAT GAC GAG AGC ATA ACT TTG GAT AAA AAC AAT TAAAAATCCT	1373
Ile Ser Asn Asp Glu Ser Ile Thr Leu Asp Lys Asn Asn	
210 215 220	
TATCTCTTTC GGTTTCAGTTC TCATTATTTT CAAATAACCT CCCGGTTGGA TCTTTTCCAA	1433
CGGGAGGTTT TATTGGAAAG GTTAAGTATA GTATACTCCG ATTCCATCCA GAGGAATGCT	1493
TGAAACACCT CCGTCACTAG	1513

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 56 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique (oligonucléotide synthétique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:14:

CCCCCTACG TAGCGGCCGC CCCGGCCGGT AACCTAGGAA GTCAGCGCCC TGCACC 56

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 56 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique (oligonucléotide synthétique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:15:

CCCCCTACG TAGGCCGGG CGGCCGGGT TACCTAGGC CTCGTGATAC GCCTAT 56

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 31 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique (oligonucléotide synthétique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:16:

ACGAGGAAAG ATGCTGTTCT TGTAATGAG T 31

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 19 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique (oligonucléotide synthétique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:17:

TACCTTGCTT ACAAACCCC 19

REVENDICATIONS

1 - Xylanase, caractérisée en ce qu'elle provient de la souche de *Bacillus* sp. 720/1 (LMG P-14798) ou d'un dérivé ou mutant de cette souche.

5 2 - Xylanase isolée et purifiée, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence d'acides aminés de 1 à 221 acides aminés (SEQ ID NO:1) ou une séquence modifiée dérivée de celle-ci.

10 3 - Xylanase selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle est synthétisée sous forme d'un précurseur contenant 248 acides aminés (SEQ ID NO:4).

4 - Xylanase, caractérisée en ce qu'elle est constituée d'un seul polypeptide ayant un poids moléculaire d'environ 25 kDa et qu'elle a un point isoélectrique, déterminé, compris entre environ 9,5 et environ 9,7.

15 5 - Xylanase, caractérisée en ce qu'elle est produite, de façon hétérologue, par un microorganisme du genre *Bacillus*.

6 - Une culture isolée et purifiée de *Bacillus* sp. 720/1 (LMG P-14798) et culture dérivée ou mutée de celle-ci.

20 7 - Molécule d'ADN comprenant la séquence de nucléotides (SEQ ID NO:2) qui code pour la xylanase mature de *Bacillus* sp. 720/1 (LMG P-14798) ou une séquence modifiée dérivée de celle-ci.

25 8 - Molécule d'ADN selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence de nucléotides (SEQ ID NO:5) qui code pour le précurseur de la xylanase de *Bacillus* sp. 720/1 ou une séquence modifiée dérivée de celle-ci.

9 - Molécule d'ADN selon la revendication 7 ou 8, caractérisée en ce qu'elle comprend tout le gène (SEQ ID NO:10) de la xylanase de *Bacillus* sp. 720/1.

30 10 - Vecteur d'expression ou vecteur d'intégration chromosomique contenant la molécule d'ADN selon la revendication 7, 8

ou 9.

11 - Souche transformée de *Bacillus* comprenant la molécule d'ADN selon la revendication 7, 8 ou 9.

5 12 - Souche transformée de *Bacillus* comprenant le vecteur d'expression ou le vecteur d'intégration chromosomique selon la revendication 10.

13 - Souche transformée selon la revendication 11 ou 12, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une souche de *Bacillus licheniformis*.

10 14 - Xylanase produite par la souche transformée de *Bacillus* selon la revendication 11, 12 ou 13.

15 15 - Procédé pour la production d'une xylanase selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comprend la culture de la souche de *Bacillus*, ou d'un dérivé de cette souche capable de produire la xylanase, dans un milieu nutritif approprié contenant des sources de carbone et d'azote et des sels minéraux sous condition d'aérobiose et la récolte de la xylanase ainsi obtenue.

20 16 - Procédé pour la préparation d'une xylanase selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend l'isolement d'un fragment d'ADN codant pour la xylanase, l'insertion de ce fragment d'ADN dans un vecteur approprié, l'introduction de ce vecteur dans un hôte approprié ou l'introduction de ce fragment d'ADN dans le chromosome d'un hôte
25 approprié, la culture de cet hôte, l'expression de la xylanase et la récolte de la xylanase.

17 - Utilisation d'une xylanase selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou selon la revendication 14 pour le traitement de la pâte à papier.

30 18 - Utilisation d'une xylanase selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou selon la revendication 14 en alimentation

animale.

19 - Une composition enzymatique contenant une xylanase selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou selon la revendication 14, et au moins un additif.

FIG. 1a

CAA	ATC	GTC	ACC	GAC	AAT	TCC	ATT	GGC	AAC	CAC	GAT	GGC	TAT	GAT	TAT
Gln	Ile	Val	Thr	Asp	Asn	Ser	Ile	Gly	Asn	His	Asp	Gly	Tyr	Asp	Tyr
1				5					10					15	
GAA	TTT	TGG	AAA	GAT	AGC	GGT	GGC	TCT	GGG	ACA	ATG	ATT	CTC	AAT	CAT
Glu	Phe	Trp	Lys	Asp	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Thr	Met	Ile	Leu	Asn	His
			20					25					30		
GGC	GGT	ACG	TTC	AGT	GCC	CAA	TGG	AAC	AAT	GTT	AAC	AAC	ATA	TTA	TTC
Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ala	Gln	Trp	Asn	Asn	Val	Asn	Asn	Ile	Leu	Phe
			35				40					45			
CGT	AAA	GGT	AAA	AAA	TTC	AAT	GAA	ACA	CAA	ACA	CAC	CAA	CAA	GTT	GGT
Arg	Lys	Gly	Lys	Lys	Phe	Asn	Glu	Thr	Gln	Thr	His	Gln	Gln	Val	Gly
	50					55					60				
AAC	ATG	TCC	ATA	AAC	TAC	GGA	GCC	AAC	TTC	CAA	CCA	AAT	GGT	AAT	GCG
Asn	Met	Ser	Ile	Asn	Tyr	Gly	Ala	Asn	Phe	Gln	Pro	Asn	Gly	Asn	Ala
65					70					75					80
TAT	TTA	TGC	GTC	TAT	GGT	TGG	ACT	GTT	GAC	CCT	CTT	GTC	GAA	TAT	TAT
Tyr	Leu	Cys	Val	Tyr	Gly	Trp	Thr	Val	Asp	Pro	Leu	Val	Glu	Tyr	Tyr
				85					90					95	
ATT	GTC	GAC	AGT	TGG	GGC	AAC	TGG	CGT	CCA	CCA	GGA	GCA	ACG	CCT	AAG
Ile	Val	Asp	Ser	Trp	Gly	Asn	Trp	Arg	Pro	Pro	Gly	Ala	Thr	Pro	Lys
			100					105					110		
GGG	ACC	ATC	ACT	GTT	GAT	GGA	GGA	ACA	TAT	GAT	ATC	TAC	GAG	ACT	CTT
Gly	Thr	Ile	Thr	Val	Asp	Gly	Gly	Thr	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Glu	Thr	Leu
			115				120					125			
AGA	GTC	AAT	CAA	CCC	TCC	ATT	AAG	GGG	ATT	GCC	ACA	TTT	AAA	CAA	TAT
Arg	Val	Asn	Gln	Pro	Ser	Ile	Lys	Gly	Ile	Ala	Thr	Phe	Lys	Gln	Tyr
	130					135					140				
TGG	AGT	GTT	CGA	AGA	TCG	AAA	CGC	ACG	AGT	GGC	ACG	ATT	TCT	GTC	AGC
Trp	Ser	Val	Arg	Arg	Ser	Lys	Arg	Thr	Ser	Gly	Thr	Ile	Ser	Val	Ser
145					150					155					160

FIG. 1b

AAC	CAC	TTT	AGA	GCG	TGG	GAA	AAC	TTA	GGG	ATG	AAT	ATG	GGG	AAA	ATG
Asn	His	Phe	Arg	Ala	Trp	Glu	Asn	Leu	Gly	Met	Asn	Met	Gly	Lys	Met
				165					170					175	

TAT	GAA	GTC	GCG	CTT	ACT	GTA	GAA	GGC	TAT	CAA	AGT	AGC	GGA	AGT	GCT
Tyr	Glu	Val	Ala	Leu	Thr	Val	Glu	Gly	Tyr	Gln	Ser	Ser	Gly	Ser	Ala
			180					185					190		

AAT	GTA	TAT	AGC	AAT	ACA	CTA	AGA	ATT	AAC	GGT	AAC	CCT	CTC	TCA	ACT
Asn	Val	Tyr	Ser	Asn	Thr	Leu	Arg	Ile	Asn	Gly	Asn	Pro	Leu	Ser	Thr
			195				200					205			

ATT	AGT	AAT	GAC	GAG	AGC	ATA	ACT	TTG	GAT	AAA	AAC	AAT
Ile	Ser	Asn	Asp	Glu	Ser	Ile	Thr	Leu	Asp	Lys	Asn	Asn
	210						215				220	

FIG. 2a

AAATTGAATT GTGTATATCT AATGATAACG ACAAATCGTC ACTGTTTTTA AACTAATCTC
 AAACCAATAC TTCTTTATTT AACGCTAACC ACTTGCAATC TTATCACAAG AACATTCTTT
 ATAGGAACTT TCCCATTGTC AAGACGATAA AAAATCTTTT TCCCCTATTT TATCTTATCG
 CCTTGATCGG TTTAATTTGT AAACCTTTATT TTAGTTTACG TGATGTTCCC TCATTCATAC
 CATTAATCAC AGTTAACGCT AGAGTCATCT TTTTTCGGTT CTCAAAAATA CCTGAAGAAC
 ATTTATGTCA TATTTTCTCA CGCCGCTCCA TAATGGAATA TATATACTCT TTTATACATA
 TTAAGTAAAT TAGTATATAC TTGCGTTATC AAAATGTGAG ATAATCTAAT TGATCAAACA
 AGCAGCTATC CAAAAACAC TGATGTTGAC CTCTTAAAGA AGTGTCAC TA TCTATGAAAA
 GATAATTATC CAGTTTCAAA ATTTGAAATA GTGTGTATGG AATAGTTTGA ATGTCAACTG
 CTGTGAAAGG AGGGTAGGTA GTACCGTAGA CTTCAATTACC AAAAATTAGT TGTAACAAAA
 TTAAAAGGAG GAATGCCTA ATG AGA CAA AAG AAA TTG ACG TTG ATT TTA GCC
 Met Arg Gln Lys Lys Leu Thr Leu Ile Leu Ala
 -25 -20

TTT TTA GTT TGT TTT GCA CTA ACC TTA CCT GCA GAA ATA ATT CAG GCA
 Phe Leu Val Cys Phe Ala Leu Thr Leu Pro Ala Glu Ile Ile Gln Ala
 -15 -10 -5

CAA ATC GTC ACC GAC AAT TCC ATT GGC AAC CAC GAT GGC TAT GAT TAT
 Gln Ile Val Thr Asp Asn Ser Ile Gly Asn His Asp Gly Tyr Asp Tyr
 1 5 10 15

GAA TTT TGG AAA GAT AGC GGT GGC TCT GGG ACA ATG ATT CTC AAT CAT
 Glu Phe Trp Lys Asp Ser Gly Gly Ser Gly Thr Met Ile Leu Asn His
 20 25 30

GGC GGT ACG TTC AGT GCC CAA TGG AAC AAT GTT AAC AAC ATA TTA TTC
 Gly Gly Thr Phe Ser Ala Gln Trp Asn Asn Val Asn Asn Ile Leu Phe
 35 40 45

CGT AAA GGT AAA AAA TTC AAT GAA ACA CAA ACA CAC CAA CAA GTT GGT
 Arg Lys Gly Lys Lys Phe Asn Glu Thr Gln Thr His Gln Gln Val Gly
 50 55 60

AAC ATG TCC ATA AAC TAC GGA GCC AAC TTC CAA CCA AAT GGT AAT GCG
 Asn Met Ser Ile Asn Tyr Gly Ala Asn Phe Gln Pro Asn Gly Asn Ala
 65 70 75 80

FIG. 2b

TAT TTA TGC GTC TAT GGT TGG ACT GTT GAC CCT CTT GTC GAA TAT TAT
 Tyr Leu Cys Val Tyr Gly Trp Thr Val Asp Pro Leu Val Glu Tyr Tyr
 85 90 95

ATT GTC GAC AGT TGG GGC AAC TGG CGT CCA CCA GGA GCA ACG CCT AAG
 Ile Val Asp Ser Trp Gly Asn Trp Arg Pro Pro Gly Ala Thr Pro Lys
 100 105 110

GGG ACC ATC ACT GTT GAT GGA GGA ACA TAT GAT ATC TAC GAG ACT CTT
 Gly Thr Ile Thr Val Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Leu
 115 120 125

AGA GTC AAT CAA CCC TCC ATT AAG GGG ATT GCC ACA TTT AAA CAA TAT
 Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile Lys Gly Ile Ala Thr Phe Lys Gln Tyr
 130 135 140

TGG AGT GTT CGA AGA TCG AAA CGC ACG AGT GGC ACG ATT TCT GTC AGC
 Trp Ser Val Arg Arg Ser Lys Arg Thr Ser Gly Thr Ile Ser Val Ser
 145 150 155 160

AAC CAC TTT AGA GCG TGG GAA AAC TTA GGG ATG AAT ATG GGG AAA ATG
 Asn His Phe Arg Ala Trp Glu Asn Leu Gly Met Asn Met Gly Lys Met
 165 170 175

TAT GAA GTC GCG CTT ACT GTA GAA GGC TAT CAA AGT AGC GGA AGT GCT
 Tyr Glu Val Ala Leu Thr Val Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ala
 180 185 190

AAT GTA TAT AGC AAT ACA CTA AGA ATT AAC GGT AAC CCT CTC TCA ACT
 Asn Val Tyr Ser Asn Thr Leu Arg Ile Asn Gly Asn Pro Leu Ser Thr
 195 200 205

ATT AGT AAT GAC GAG AGC ATA ACT TTG GAT AAA AAC AAT TAAAAATCCT
 Ile Ser Asn Asp Glu Ser Ile Thr Leu Asp Lys Asn Asn
 210 215 220

TATCTCTTTC GGTTCAAGTTC TCATTATTTT CAAATAACCT CCCGGTTGGA TCTTTTCCAA
 CGGGAGGTTT TATTGAAAAG GTTAAGTATA GTATACTCCG ATTCCATCCA GAGGAATGCT
 TGAAACACCT CCGTCACTAG

Fig. 3

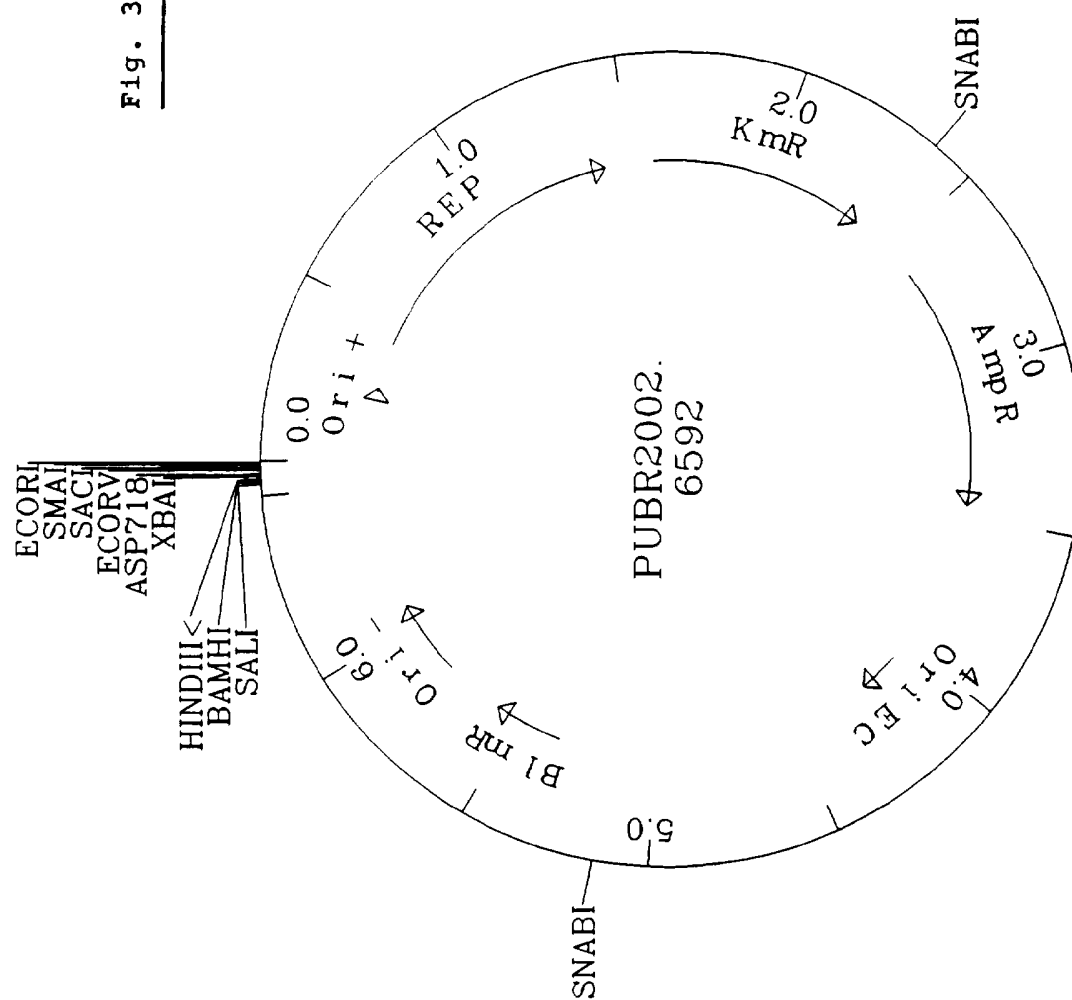


Fig. 4

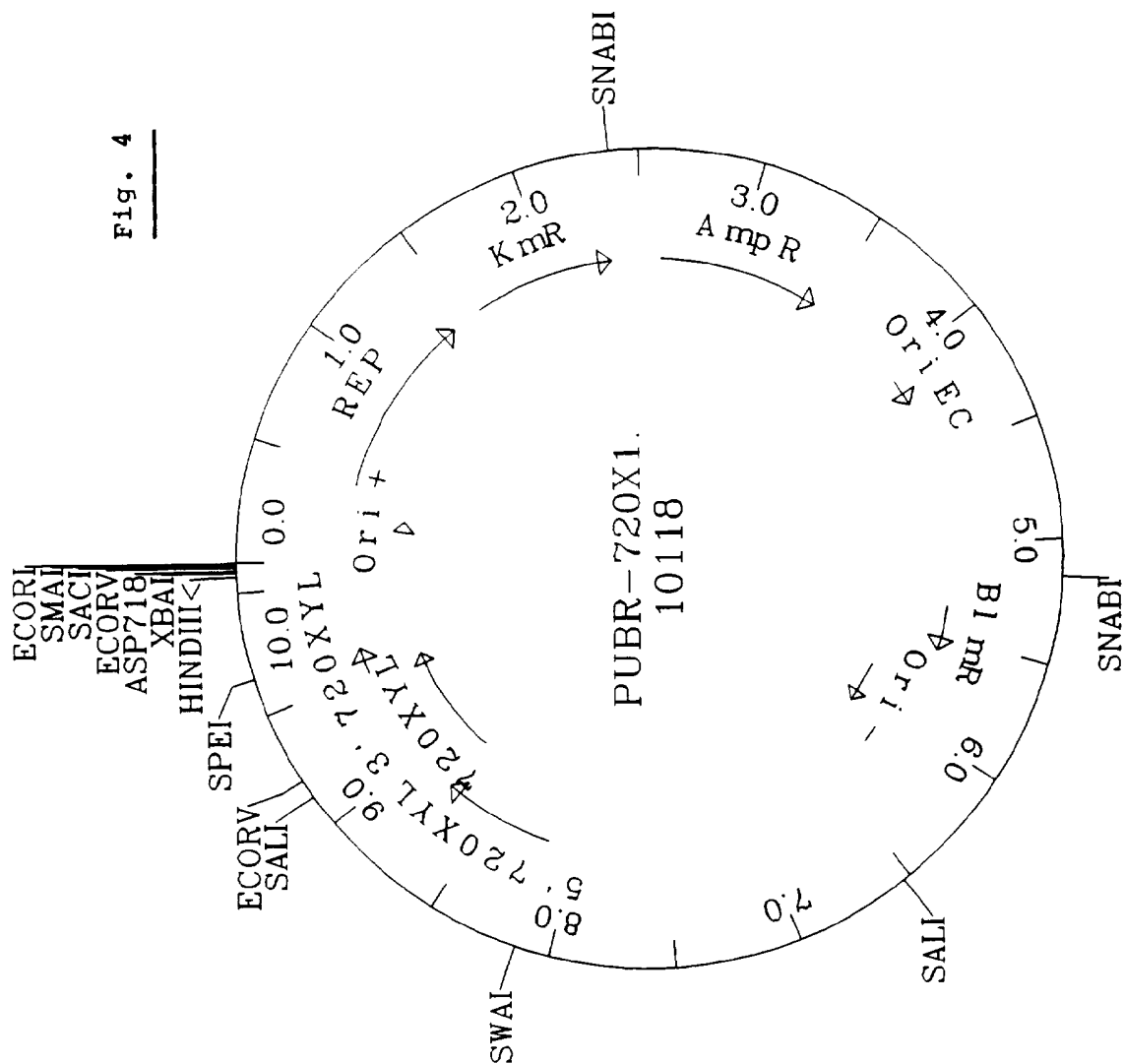
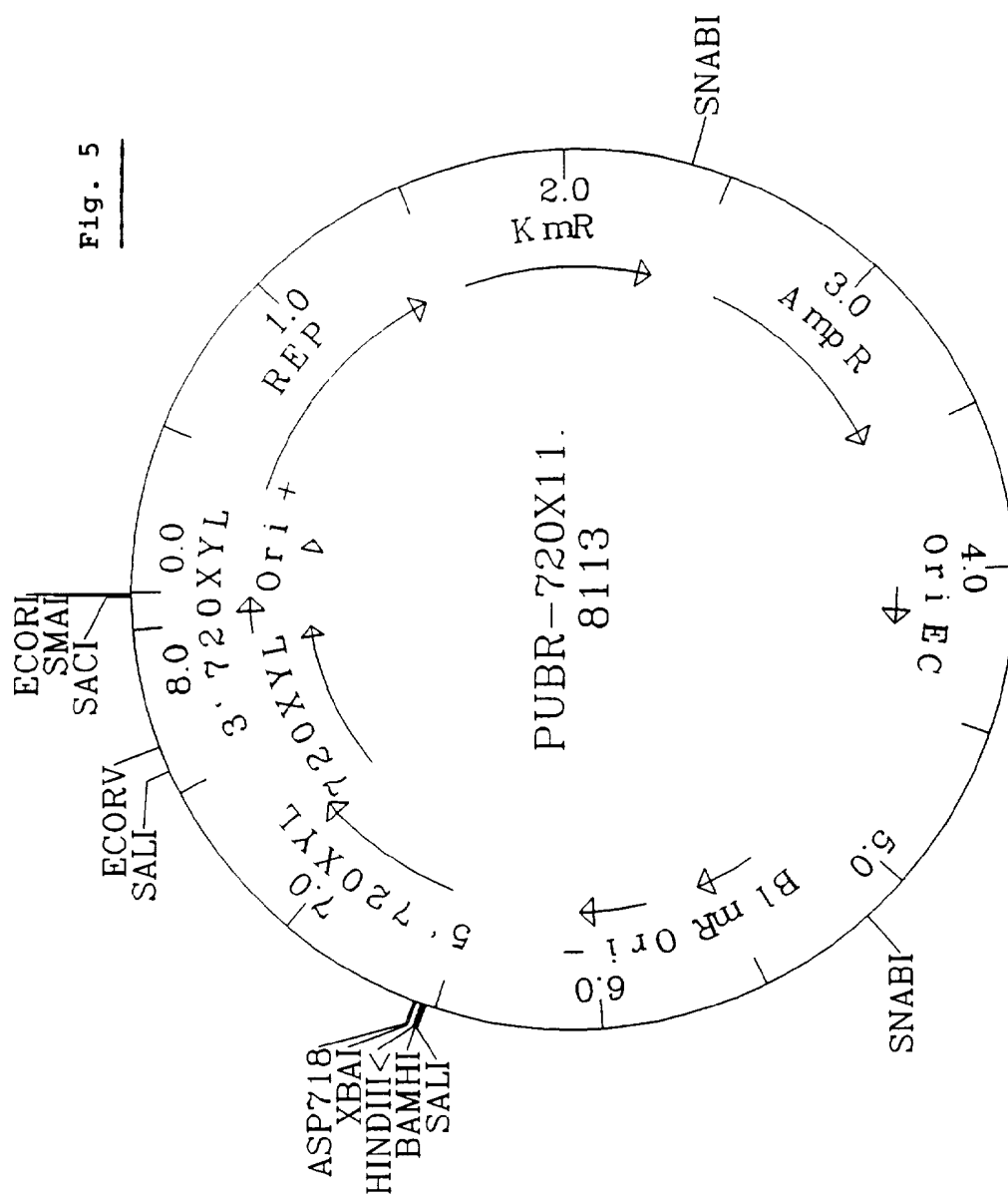


Fig. 5





Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale

BO 5210
BE 9400706

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)
X	WO-A-94 01532 (NOVO NORDISK) 20 Janvier 1994 * revendications 8,9 * ---	4-6,14, 15,17,19	C12N15/56 C12N9/24 A23L3/34 D21C3/00
X	WO-A-94 04664 (NOVO NORDISK) 3 Mars 1994 * page 11, ligne 17 - ligne 24 * ---	4-6,14, 15,17	C12N1/21 //(C12N1/21, C12R1:07)
E	EP-A-0 634 490 (SOLVAY) 18 Janvier 1995 * exemples 6-9 * ---	4-6,14, 15	
X	JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol.3, no.3, 1993 pages 139 - 145 YU JU-HYUN ET AL. 'Nucleotide sequence and analysis of a xylanase gene (xynS) from alkali-tolerant Bacillus sp. YA-14 and comparison with other xylanases' * figure 3 * ---	1-3,716	
X	FEBS LETTERS, vol.171, no.2, 1984, AMSTERDAM NL pages 197 - 201 EIICHIRO FUKUSAKI ET AL. 'The complete nucleotide sequence of the xylanase gene (xynA) of Bacillus pumilus' * figure 2 * -----	1-3,7-16	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6) C12N A23L D21C
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
25 Avril 1995		Espen, J	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BO 5210
BE 9400706

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

25-04-1995

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9401532	20-01-94	AU-B- 4417193	31-01-94
		FI-A- 946186	30-12-94

WO-A-9404664	03-03-94	AU-B- 4944693	15-03-94

EP-A-0634490	18-01-95	GB-A- 2279955	18-01-95
		AU-B- 6743294	27-01-95
		CA-A- 2128050	16-01-95
		FI-A- 943389	16-01-95
		JP-A- 7067637	14-03-95
		NO-A- 942652	16-01-95
