

Patente Nº 88624

## - R E S U M O -

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA GLICOPROTEÍNA XILANASE  
DE BAIXO PESO MOLECULAR"

A presente invenção refere-se a uma endo-xilanase de baixo peso molecular que foi isolada a partir de uma actinomiceto da estirpe Chainia. A enzima purificada que foi parcialmente sequenciada é uma glicoproteína com um peso molecular entre 5.000 e 9.000 estimado em  $6.000 \pm 1.000$ . Esta pequena molécula de xilanase tem actividade específica para xilano, convertendo-a selectivamente em oligossacaridos, não tendo a enzima, actividade significativa para celulose.

1

Descrição do objecto do invento  
que

5

IOWA STATE UNIVERSITY RESEARCH  
FOUNDATION, INC., norte-america-  
na, industrial, com sede em 315  
Beardshear AMES, IOWA 50011, Esta-  
dos Unidos da América, pretende  
obter em Portugal para: "PROCESSO  
PARA A PREPARAÇÃO DE UMA GLICOPRO-  
TEINA XILANASE DE BAIXO PESO MOLE  
CULAR"

10

15

O presente invento diz respeito a um proces-  
so para a preparação de enzimas xilanase que actuam sobre xi-  
lano de plantas, por exemplo xilanases produzida por micror-  
organismos.

20

Endo-xilanases (1,4- $\beta$ -D-xilano xilanhidro-  
lase) que hidrolizam ligações principalmente interiores  
(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-xilosilo na hemicelulose xilano da planta, foram  
isoladas a partir de fungos, bactérias, plantas e invertebra-  
dos. Mas houve relativamente pouca investigação de êndo-xila-  
nases provenientes de actinomicetes, apesar da grande impor-  
tância científica e comercial desta família bacteriana.

25

30

Na primeira referência conhecida, Iizuka e  
Kawaminami (1965) descreveram uma endo-xilanase proveniente  
de Streptomyces xilophagus. Produziu inicialmente xilobiose  
e xilo-oligossacarídeos maiores a partir de xilano, mas pro-  
duziu finalmente xilobiose e D-xilose. Mais tarde, os

35

1 dois relatórios, Kusakabe et al. (1977) mediram a actividade  
e a estabilidade óptimas de uma enzima análoga proveniente  
de Streptomyces. Esta endo-xilanase tem um peso molecular  
de aproximadamente 40.500. Produziu D-xilose e xilobiase  
5 a partir de xilano depois de inicialmente formar xilo-oligos  
sacarídeos com comprimento intermédio, e, evidentemente, te-  
ve alguma actividade xilositransferase, porque produziu xilo  
biase mas não D-xilose a partir de xilotriose. [Kusakabe,  
Kawaguchi et al. (1977); e Kusakabe, Yasui et al. (1977).]  
10 Nakajima et al. (1984) descreveu também uma endo-xilanase  
Streptomyces análoga com peso molecular de aproximadamente  
43.000 daltons.

Investigadores do Laboratório Nacional de  
15 Química de Pune, Índia, descreveram o isolamento de estirpe  
produtora de enzima de uma estirpe actinomicete do género  
Chainia. [Srinivasan et al. (1983).] A esta estirpe foi  
atribuída a identificação de código "NCL 82-5-1" e o seu es-  
tudo foi efectuado no Laboratório Nacional de Química (daqui  
em diante LNQ). [Srinivasan et al. (1984).] A estirpe  
20 Chainia LNQ-82-5-1 não pôde ser obtida fora do LNQ, e tem  
sido mantida pelo LNQ numa base não pública.

Este pedido de patente baseia-se na descober-  
ta de uma nova endo-xilanase que pode ser obtida por fermen-  
tação de estirpe LNQ-82-5-1 sobre um meio que contém uma  
25 fonte de xilano, separação do líquido de fermentação dos só-  
lidos, e a sujeição do líquido a uma série de separações cro-  
matográficas para isolar e purificar a endo-xilanase de acor-  
do com o presente invento, que, na presente descrição, é de-  
nominada Xilanase II. Esta enzima é uma glicoproteína com  
30 um peso molecular pequeno. Tanto quanto se sabe, a Xilana-  
se II tem o menor peso molecular de qualquer xilanase descri-  
ta até agora. A Xilanase II foi obtida em forma essencialmen-  
te pura. O seu peso molecular absoluto expresso em daltons  
é inferior a 9.000 e superior a 5.000. Com base nos dados  
35

1 disponíveis, o peso molecular estimado em daltons é 6000  $\pm$   
1000. Determinaram-se outros critérios de identificação. O  
conteúdo de amino ácido aproximado e o número de amino áci-  
5 dos são conhecidos, e fez-se a sequência da maior parte da  
espinha dorsol amino ácida da proteína glicosilada. De fac-  
to, confirmou-se uma sequência exacta por meio de análise  
repetida da maior parte da proteína.

10 A Xilanase II tem propriedades para utiliza-  
ção no tratamento de fibras de madeira. Tem actividade enzi-  
mática específica para xilano com actividade enzimática in-  
significante para celulose. O seu peso molecular pequeno  
permite à Xilanase II penetrar em fibras de madeira, de maneir  
15 ra que pode efectuar uma degradação selectiva de xilano. A  
xilanase II transforma xilano em xilo-oligossacarídeos. A  
Xilanase II pode ser utilizada também para actuar sobre xi-  
lano noutros substratos, visto que não têm uma acção enzimá-  
tica apreciável contra derivados de celulose ou outros oli-  
gossacarídeos como amido.

20 Os desenhos anexos são gráficos de separações  
cromatográficas das xilanases. A Figura 1 representa a sepa-  
ração inicial da actividade endo-xilanase do meio de fermen-  
tação, estando incluídas no pico representado ambas as xila-  
nases com molécula grande. A Figura 2 representa uma outra  
25 resolução desta actividade endo-xilanase em duas fracções  
sendo o primeiro pico uma xilanase com molécula grande (Xi-  
lanase I), e o segundo pico a xilanase com molécula peque-  
na (Xilanase II) do presente invento.

30 O presente invento diz respeito a uma nova en-  
do-xilanase que é uma glicoproteína substancialmente pura  
que tem um peso molecular superior a 5000 e inferior a 9000  
(expresso em daltons). Esta enzima, designada por Xilanase  
II, é caracterizada por actividade enzimática específica para  
35 xilano com actividade insignificante para celulose. Pelo mé-  
todo desdrito adiante, a Xilanase II pode ser purificada até

1 se obter homogeneidade essencial. A Xilanase II é também ca-  
racterizada por uma sequência de 24 amino ácidos, conforme é  
descrito adiante.

5 O processo preferido para a preparação de Xi-  
lanase II compreende a utilização da estirpe CHAINIA LNQ-  
-82-5-1, que estará permanente à disposição do público. A  
utilização da estirpe LNQ-82-5-1 para a produção de Xilanase  
II implica os procedimentos gerais seguintes, descritos de  
10 maneira pormenorizada pelos Exemplos Experimentais.

LNQ-82-5-1 é um actinomicete formador de es-  
clerótias do género Chainia que segrega isomerase glucose  
extracelular, isomerases xilose e xilanases quando cultivado  
num meio apropriado. Por exemplo, pode empregar-se um meio  
15 extracto de fermento de farelo de trigo para produzir as en-  
do-xilanases extracelulares, que incluem a Xilanase I de  
molécula grande, que tem um peso molecular relativo aparente  
da ordem de 25.000, e a Xilanase II de molécula pequena do  
presente invento.

20 Os meios de fermentação que podem ser utili-  
zados para a cultura de LNQ-85-5-1 são descritos por Sriniv-  
vasan et al. (1983) e Srinivasan et al (1984). Para a pre-  
paraçãp de culturas de inoculação, a estirpe Chainia pode  
ser cultivada e/ou conservada sobre ágar dextrose de batata  
25 e ágar peptona glucose extracto de malte. É desejável sub-  
cultura periódica para manter a viabilidade. Os meios de fer-  
mentação aquosa para a produção de xilanase devem conter uma  
fonte de xilano. Podem empregar-se, por exemplo, farelo  
de trigo e fontes vegetais análogas que contenham xilano.  
30 Mais especificamente, pode preparar-se um meio apropriado  
a partir de farelo de trigo a 5% e extracto de fermento a  
1%. O pH de partida pode ser aproximadamente 5,8, e a fer-  
mentação pode ser efectuada a temperaturas de cerca de 28°C.  
A fermentação prossegue até estarem libertas as xilanases  
35 extracelulares. São apropriados tempo de fermentação desde

1 90 até 120 horas, mas adoptar-se tempos de menor ou maior  
duração. O progresso da fermentação pode ser acompanhado por  
meio da recolha de amostras e experiências para determinar  
a sua acitivade xilanase extracelular.

5 Quando se completa a fermentação, as células  
Chainia são separadas do meio de fermentação aquosa, quer  
dizer, por centrifigação, filtração ou outro procedimento.  
10 O meio isento de células que contêm xilanases é depois tra-  
tado para recuperar a endo-xilanase Xilanase II. Num proces-  
so preferido, adiciona-se etanol ao meio clarificado para  
precipitar as xilanases, incluindo a Xilanase I de molécula  
grande e a Xilanase II de molécula pequena pretendida. As xi-  
lanases precipitadas são redissolvidas e submetidas a uma  
15 série de separações cromatográficas. A Xilanase II é prepa-  
rada por este meio numa forma muito purificada.

## EXEMPLOS EXPERIMENTAIS

### Materiais e Processos

20 Condições de cultura: O meio de cultura e fermentação in-  
clui farelo de trigo (5,0 g) e o extracto de fermento (1,0 g)  
em 100 ml de água destilada. O meio esteve em autoclave a  
25 121°C durante 40 minutos. Utilizou-se cultura com sete dias,  
mantida em corte agar dextrose de batata a 2% para inocular  
os balões de inoculação. Os balões foram seguidamente incu-  
bados durante 72 horas e foram utilizados como inóculo. Os  
balões experimentais foram inoculados com o inóculo acima  
30 e incubados a 30°C num sacudidor rotativo (200 rpm) durante  
120 horas. Recolheu-se filtrado de cultura depois de centri-  
fugação (700 x g) como sobrenadante límpido.

35 Experiência de xilanase: Mediu-se a actividade xilanase por  
estimativa dos açúcares redutores produzidos, como equiva-

1 lentes xilose, por meio de reagente ácido 3,5-dinitro-salicílico (Miller, 1959) assim como pelo método de Somogyi e Nelson (Nelson, 1944).

5 Produção e Isolamento de Xilanase II

10 Chainia sp. (LNQ-82-5-1) foi cultivada no meio acima, que continha farelo como fonte de carbono principal. Depois da cultura com a duração de 120 horas, conforme descrito, separaram-se as células e resíduos sólidos do caldo de cultura por meio de centrifugação a 700 x g durante 20 minutos.

15 Purificação de Enzima Efectuaram-se os seguintes passos a uma temperatura de 0 a 4°C, salvo indicação em contrário:

15 Fase I: Precipitação em álcool

20 O filtrado de cultura (350 ml, 3.100 U) foi concentrado por meio de precipitação da enzima com três volumes de etanol destilado arrefecido a 4°C conforme descrito no parágrafo Materiais e Métodos. O precipitado foi recuperado por centrifugação e seco sob vácuo e armazenado a -10°C até utilização ulterior. A recuperação de actividade xilanase foi de 85-90 % aproximadamente.

25 Fase II: O precipitado em álcool (1,58 g, 2.800 U) de enzima proveniente da Fase I foi dissolvido em 50 ml de 50mM, tampão fosfato de sódio, pH 7,1. As partículas sólidas não dissolvidas provenientes do precipitado foram separadas por centrifugação, e a solução de enzima límpida foi depois purificada sobre DEAE-celulose em tratamento descontínuo.

35 DEAE-celulose (tratamento descontínuo): DEAE-celulose pré-activada com NaOH 1N e HCl 1N foi equilibrada com 50 mM, tampão fosfato de sódio, pH 7,1. O bolo de DEAE-celulose sólido obtido por filtração de 290 ml de pasta de DEAE-celulose

1 (que contém 25 mg de peso seco por ml) foi posto em suspensão  
em 50 ml de solução de enzima (2.800 U). Este tratamento foi  
efectuado enquanto se mantinha agitação constante, durante  
30 minutos, e a pasta foi filtrada através de papel de fil-  
5 tro Whatman No. 1. O filtrado foi recolhido e o bolo de  
DEAE-celulose foi novamente posto em suspensão duas vezes  
no mesmo tampão, empregando 25 ml de tampão de cada vez para  
recuperar a enzima (875 U).

10 **Fase III: DEAE-Fractogel-TSK-650 S**

**cromatografia permutadora de iões**

A solução de enzima concentrada proveniente  
do tratamento com DEAE-celulose (Fase II) foi recromatogra-  
15 fada sobre coluna DEAE-Fractogel-TSK-650 S (2,0 x 90,0 cm),  
previamente equilibrada com 50 mM, tampão fosfato de sódio,  
pH 7,1. A coluna foi lavada com o mesmo tampão e recolheram-  
-se fracções de 4 ml de 10 em 10 minutos. O pigmento amarelo  
proveniente da amostra carregada foi adsorvido no cimo da co-  
20 lona. Juntaram-se fracções que continham a xilanase não ad-  
sorvia 580 ml) e concentraram-se por ultrafiltração até res-  
tarem 12 ml (765 U). A enzima purificada nesta fase deu um  
só pico para a actividade xilanase, conforme representado  
na Figura 1.

25 **Fase IV: Separação de duas xilanases**  
**por filtração em gel**

A solução de enzima concentrada proveniente  
da Fase III foi utilizada para nova purificação por coluna  
30 Sephadex G-50 (2,5 por 110 cm), 50 mM, tampão fosfato de  
sódio, pH 7,1 utilizado para carga e eluição da enzima. Os  
perfis da actividade xilanase e da eluição de proteína es-  
tão representados na Figura 2. Recolheram-se fracções num  
35 débito igual ao mencionado na Fase III. As duas xilanases

1 designadas por Xilanase I e Xilanase II (peso molecular pe-  
queno) foram resolvidas em 2 picos em 135-170 ml (66 U) e  
265-335 ml (265 U) respectivamente. A proporção destas duas  
5 enzimas protéicas foi de 30:70 e a proporção das suas activi-  
dades foi de 20:80. As actividades específicas da Xilanase  
I e da Xilanase II purificadas foram 20,0 e 31,5 U/mg de  
proteína, respectivamente.

#### Pureza de Xilanase I e II:

10 A pureza de Xilanase I foi novamente avaliada  
por processo de concentração isoeléctrica LKB analítica. As  
amostras de proteína de xilanase II foram levadas juntamente  
com as proteínas padrão para a gama pI de 3,5 a 9,5. Carre-  
15 garam-se amostras de 20 a 30 ug num gel de placa de piliacri-  
lamida, efectuou-se electroforese durante 8 horas. A prepa-  
ração Xilanase II apresentou uma faixa de proteína única em  
electroforese de gel de disco com pH 4,3, o que indicou a sua  
homogeneidade.

20 O Quadro A resume o processo de purificação,  
recuperação e actividade específica de Xilanase II em várias  
fases.

25

30

35

QUADRO A  
PURIFICAÇÃO DE XILANASE II

Fases	Fracções	Volume (ml)	Proteína total (mg)	Actividade xilanase total (U)	Actividade específica (U/mg)	Recuperação (%)
	Filtrado impuro	350	3875	3100	0,8	100,0
Fase I	Precipitação em álcool	50	1473	2800	1,9	85,0
Fase II	DEAE-celulose	110	134	875	6,5	28,2
Fase III	Coluna DEAE-Fractogel- -TSK-650 S	80	37	765	20,6	24,7
Fase IV	Sephadex G-50					
	Xilanase	75	8/4	265	31,5	8,6

35  
30  
25  
20  
15  
10  
5  
1

1 Verificação de Pureza Adicional

5 A Xilanase II preparada conforme descrito foi submetida a cromatografia de permuta de catiões com uma coluna de CM-Trisacryl com diâmetro interior de 20 mm e 700 mm de comprimento, eluída com 0,8 ml/min de 0,025 M, tampão acetato de sódio, pH 4,5, com um gradiente 0-0,2M de cloreto de sódio. Apenas um pico de proteína saiu da coluna; continha toda actividade Xilanase II (Figura 2). Purificou-se este material por SDS-PAGE e IEF efectuadas com anfólitos pH 7 a pH 9.

10 Propriedades e Estudos Cinéticos

15 Peso molecular: Determinou-se o peso molecular de Xilanase II por quatro métodos: (1) A partir dos amino ácidos determinados por hidrólise e CLGP, adicionando um resíduo triptofano encontrado por sequenciação, o peso molecular é superior a 4087 daltons; (2) Utilizando os amino ácidos encontrados por sequenciação, o peso molecular é superior a 4214 daltons; (3) Por ensaio de SDS-PAGE, com marcadores de peso molecular de proteína LKB desde 2.512 até 16,969 daltons, o peso molecular de Xilanase II não derivada é de 6000 daltons. Depois de piridiletilação, o peso molecular é de 8000 daltons. Por meio de cromatografia de coluna com Sephadex G-50-50, utilizando os mesmos padrões de peso molecular, o peso molecular é de 5000 daltons, (4) Por meio de cromatografia de coluna com Fractogel HW-405, o peso molecular foi de 9000 daltons.

25 Natureza glicoproteína

30 Usaram-se dois métodos diferentes para determinar a natureza glicoproteína de Xilanase II.

35 (a) Método Timos:etanol:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Depois de electroforese de gel poliacrilamida, os geles foram mergulhados numa solução fixadora que continha isopropanol:ácido

1 acético: água (25:10:65) para fixar as caixas de proteína  
e separar substâncias com peso molecular pequeno, por exem-  
5 plo sacarose, glicerol e outras impurezas. Os geles foram  
mergulhados de novo durante 1 hora em timos a 0,2 % prepa-  
rado na solução de fixação acima. Os geles, depois de nova  
lavagem com a solução de fixação, foram transferidos para  
uma solução de  $H_2SO_4$  concentrado:etanol (80:20 v/v) e man-  
tidos durante 3 horas a  $35^{\circ}C$ . A glicoproteína de Xilanase II  
apresentou uma faixa vermelha sobre fundo amarelo.

10 (b) Cromatografia de afinidade sobre  
Concanavalin A Sepharose 4B:

15 A Concanavalin A Sepharose 4B tem afinidade  
para com glicoproteínas que contêm especificamente resíduos  
 $\alpha$ -D-manopiranosilo e/ou  $\alpha$ -D-glucopiranosilo ou resíduos  
2-Q-D-manopiranosilo interno. Quando se cromatografou Xila-  
nase II sobre coluna de Concanavalin A Sepharose 4B (0,6 x  
x 8,0 cm), não foi absorvida, visto que a actividade foi  
20 detectada nas primeiraq fracções eluídas. Isto sugeriu que  
a Xilanase II pode conter porções açúcar que não resíduos  
 $\alpha$ -D-manopiranosilo ou  $\alpha$ -D-glucopiranosilo.

25 Composição amino ácida:

Determinou-se a composição amino ácida de  
Xilanase II utilizando o analisador de amino ácido automá-  
tico Beckman. Os resultados obtidos estão indicados no Qua-  
dro B. Supõe-se que metionina, isoleucina, leucina, fenil-  
alanina e lisina, todos com concentrações molares muito si-  
30 milares, são representados por um resíduo amino ácido cada  
uma e que as concentrações molares de histidina e cisteína  
são anormalmente pequenas, mas também representam um resí-  
duo. O número total de resíduo é 42, mais um resíduo tripto-  
fano não medido mas inferido a partir de sequenciação amino  
35 ácida.

1 Sequenciação amino ácida:

5 Determinou-se a sequência amino ácida de Xilana-  
nase II (10 ug) num sequenciador de fase gasosa automáti-  
co. Antes da sequenciação, era essencial saber se o amino á-  
cido N-terminal de Xilanase II estava bloqueado ou livre. De-  
terminou-se isto de acordo com Chang (1983), utilizando re-  
agente isotiocianato de dimetilaminobenzeno. Verificou-se  
10 que o amino ácido N-terminal estava livre de qualquer blo-  
queio.

15 A sequência amino ácida parcial de Xilanase  
II está indicada no Diagrama A, e no Quadro B indica-se a  
composição amino ácida a partir dos dados da sequenciação.  
Os dados da sequenciação mostraram que o N-terminal da en-  
zima era alanina, enquanto que havia prolina na extremida-  
de carboxilo. O total de resíduos amino ácidos detectados  
por sequenciador foi de 40.

20 DIAGRAMA A

Sequência Amino Ácida (c) Parcial (a) para Xilanase II

25 1 7 10  
Ala-Thr-Thr-Ile-Thr-Thr-Asn-Gln-Thr-Gly-

11 20  
Tyr-Asp-Gly-Met-Tyr-Tyr-Ser-Phe-Trp-Thr-

30 21 30  
Asp-Gly-Gly-Gly-Ser-Val-Ser-Met-Thr-Leu-

31 37 40  
Asn-Gly-Gly-Gly-Thr-Tyr-Ser-Thr-Arg-Pro-

35 (Glu) (b)

1 DIAGRAMA A (Cont.)

- 5 (a) A sequência indicada prolonga-se desde o amino ácido N-terminal (Ala) até ao amino ácido 40 (Pro), mas não é completa até C-terminal.
- (b) O amino ácido 37 é provavelmente serina, mas pode ser ácido glutâmico.
- 10 (c) Empregam-se símbolos de 3 letras normalizados: Ala-alanina, Asn-Asparagina, Asp-ácido aspártico, Gln-glicina, Ile-isoleucina, Leu-leucina, Met-metionina, Phe-fenilalanina, Pro-prolina, Ser-serina, Thr-thre-  
nina, Trp-triptofano, Tyr-tirosina e Val-valina.

15 A sequência amino ácida do Diagrama A foi confirmada por análise da sequência de 24 amino ácidos desde o amino ácido (Asn) até ao amino ácido 30 (Leu). As porções restantes da molécula estão de modo geral correctas, segundo se crê, mas pode haver alguma variação amino ácida devido à indeterminação própria dos analisadores de amino ácidos. No entanto, o Diagrama A deve proporcionar deve proporcionar identificação do tipo impressão digital para Xilase II.

20

25

30

35

QUADRO BComposições Amino Ácidos de Xilanasase II

<u>Amino ácidos</u>	<u>Hidrolise e CLGP</u>	Moles %	Número de resíduos (até ao número inteiro não nulo mais próximo)	<u>Sequênciação</u>	Número de resíduos na sequência parcial (1-40)
Ácido aspártico	10,55	4	4	4 (a)	
Treonina	11,80	5	5	9	
Serina	9,99	4	4	4	
Ácido glutâmico	5,59	2	2	1 (b)	
Prolina	7,32	3	3	1	
Glicina	16,75	7	7	8	
Alanina	4,56	2	2	1	
Valina	4,47	2	2	1	
Metionina	2,77	1	1	2	
Isoleucina	2,46	1	1	1	

QUADRO B (Cont.)

<u>Amino ácidos</u>	<u>Hidrólise e CLGP</u>	<u>Sequênciação</u>
Moles %	Número de resíduos (até ao número inteiro não nulo mais próximo)	Número de resíduos na sequência parcial (1-40)
Leucina	2,59	1
Tirosina	9,10	4
Fenilalanina	2,80	1
Lisina	2,37	0
Histidina	0,80	0
Arginina	5,23	1
Cisteína	0,85	0
Triptofano	(c)	1

(a) 2 ácido aspártico, 2 asparagina.

(b) Glutamina.

(c) Não determinado.

1 Propriedades enzimáticas:

Xilanase II purificada era estável a pH 6,0 quando armazenada a  $-15^{\circ}\text{C}$ . Não se observou perda significativa de actividade durante um período de um ano.

A enzima não mostrou nenhuma acção sobre carboximetil celulose, papel de filtro, p-nitrofenil- $\beta$ -xilósido e celobiose.

10 pH óptimo: Examinou-se o efeito do pH sobre Xilanase II utilizando 50 mM, tampão citrato (pH 3,5 a 6,0) e 50 mM, tampão fosfato de sódio (pH 6,5 a 8,0). Verificou-se que o pH óptimo para a actividade de Xilanase II é 6,0 a  $50^{\circ}\text{C}$ .

15 Temperatura óptima: Observou-se o efeito da temperatura sobre Xilanase II na gama de 4 a  $80^{\circ}\text{C}$ . Verificou-se que a temperatura óptima para a actividade de Xilanase II sobre xilano solúvel é  $60^{\circ}\text{C}$  com pH 6,0).

20

Depósito de Estirpe

Em 20 de Dezembro de 1982, a estirpe Chainia LNQ-82-5-1 foi colocada em depósito restrito, não público, na Colecção Nacional de Microrganismos Industriais, Laboratório Nacional de Química, Pune, Índia, com o No. de Matrícula 2980. Outro depósito de estirpe Chainia LNQ-82-5-1 foi feito na Colecção Americana de Culturas Tipo, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852, E.U.A., com o

25

30 No. de Matrículo ATCC 53812.

35



1 ção 1, caracterizado por se preparar uma endo-xilanase que  
compreende uma glicoproteína substancialmente pura possuindo  
do as características seguintes:

5 (a) um peso molecular superior a 5.000 e  
inferior a 9.000; e

(b) actividade enzimática específica para  
xilano sem actividade enzimática apreciável para celulose.

10 3ª - Processo de acordo com a reivindicação  
1, caracterizado por a purificação se realizar até homogenei-  
dade essencial.

15 4ª - Processo de acordo com a reivindicação  
1 ou 2, caracterizado ainda por se preparar uma endo-xilana-  
se que compreende a sequência de amino ácidos 24 seguintes:

-Asn-Gln-Thr-Gly-Tyr-Asp-Gly-Met-Tyr-Tyr-Ser-Phe-  
Trp-Thr-Asp-Gly-Gly-Gly-Ser-Val-Ser-Met-Thr-Leu-

20 em que Asn, Asp, Gln, Gly, Leu, Met, Phe, Ser, Thr,  
Trp, Tyr e Val, são, respectivamente, asparagina, ácido as-  
pártico, glutamina, glicina, leucina, metionina, fenilalana-  
nina, serina, treonina, triptofano, tirosina e valina.

25 5ª - Processo de acordo com as reivindica-  
ções anteriores caracterizado por compreender uma preparação  
homogénea de glicoproteína possuindo as características se-  
guintes:

(a) um peso molecular de  $6000 \pm 1000$ ;

30 (b) actividade específica para conversão  
de xilano em xilo-oligossacaridos; e

(c) contendo a sequência amino ácido re-  
presentada por:

35 -Asn-Gln-Thr-Gly-Tyr-Asp-Gly-Met-Tyr-Tyr-Ser-Phe-  
Trp-Thr-Asp-Gly-Gly-Gly-Ser-Val-Ser-Met-Thr-Leu-

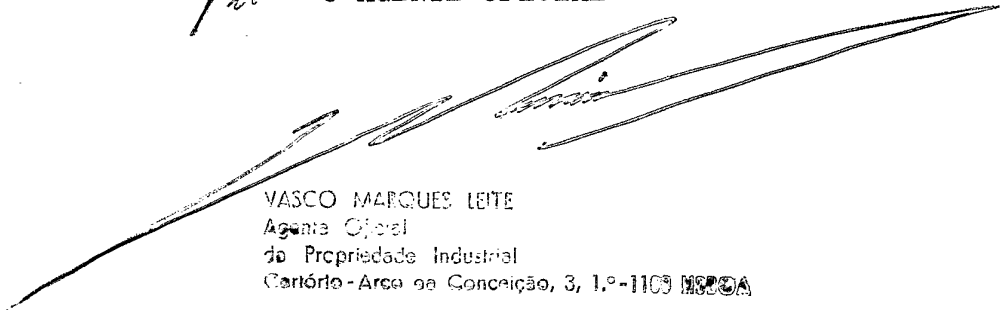
1  
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

em que Asn, Asp, Gln, Gly, Leu, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, e Val, são respectivamenteç asparagina, ácido aspártico, glutamina, glicina, leucina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, triptofano, tirosina e valina.

Lisboa, 29 SET. 1988

Por IOWA STATE UNIVERSITY RESEARCH  
FOUNDATION, INC.

*pet'* O AGENTE OFICIAL



VASCO MARQUES LEITE  
Agente Oficial  
da Propriedade Industrial  
Cartório - Arco da Conceição, 3, 1.º-1109 LISBOA

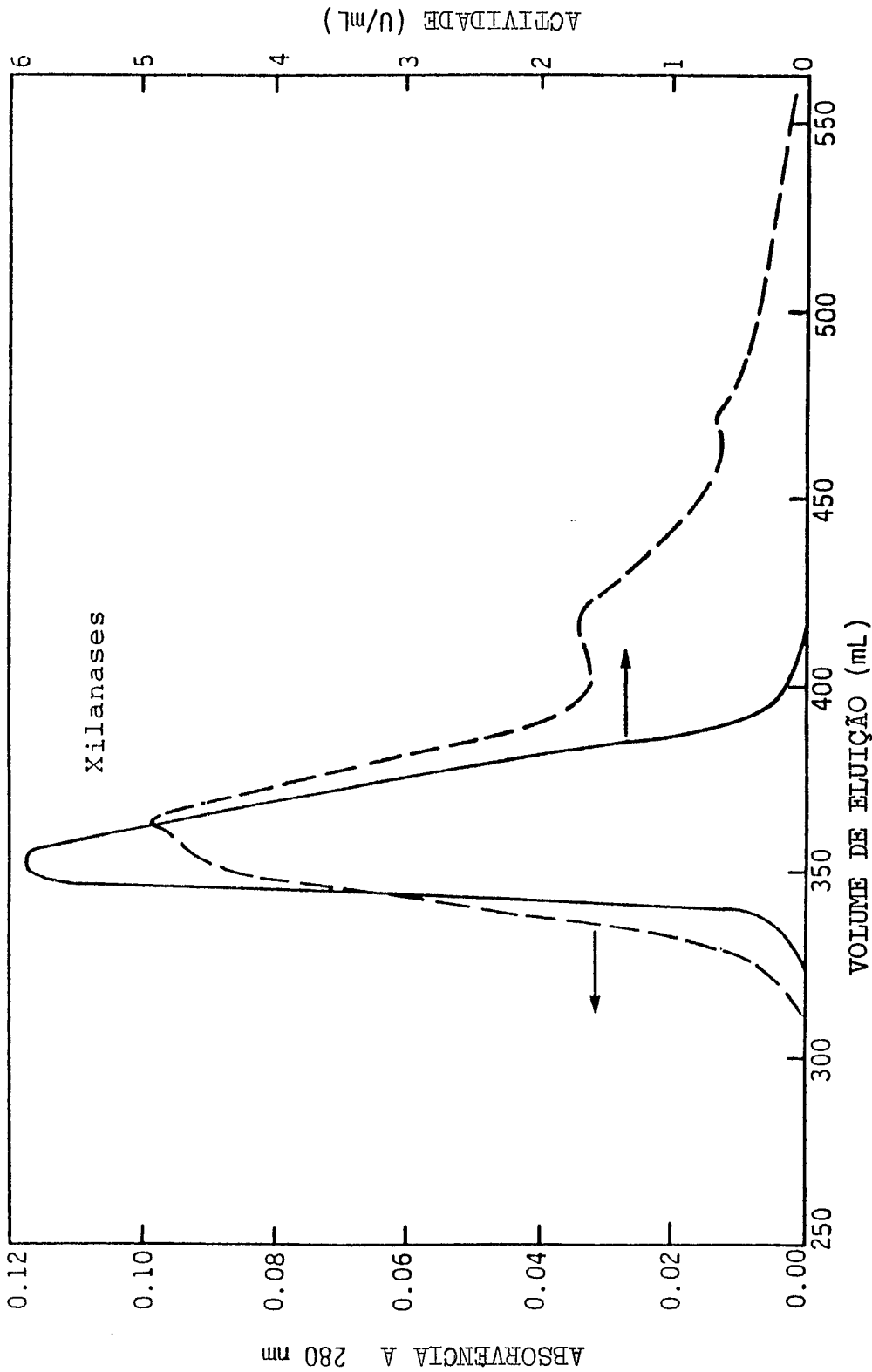
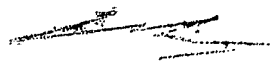


FIG. 1

0-057

Xilanases

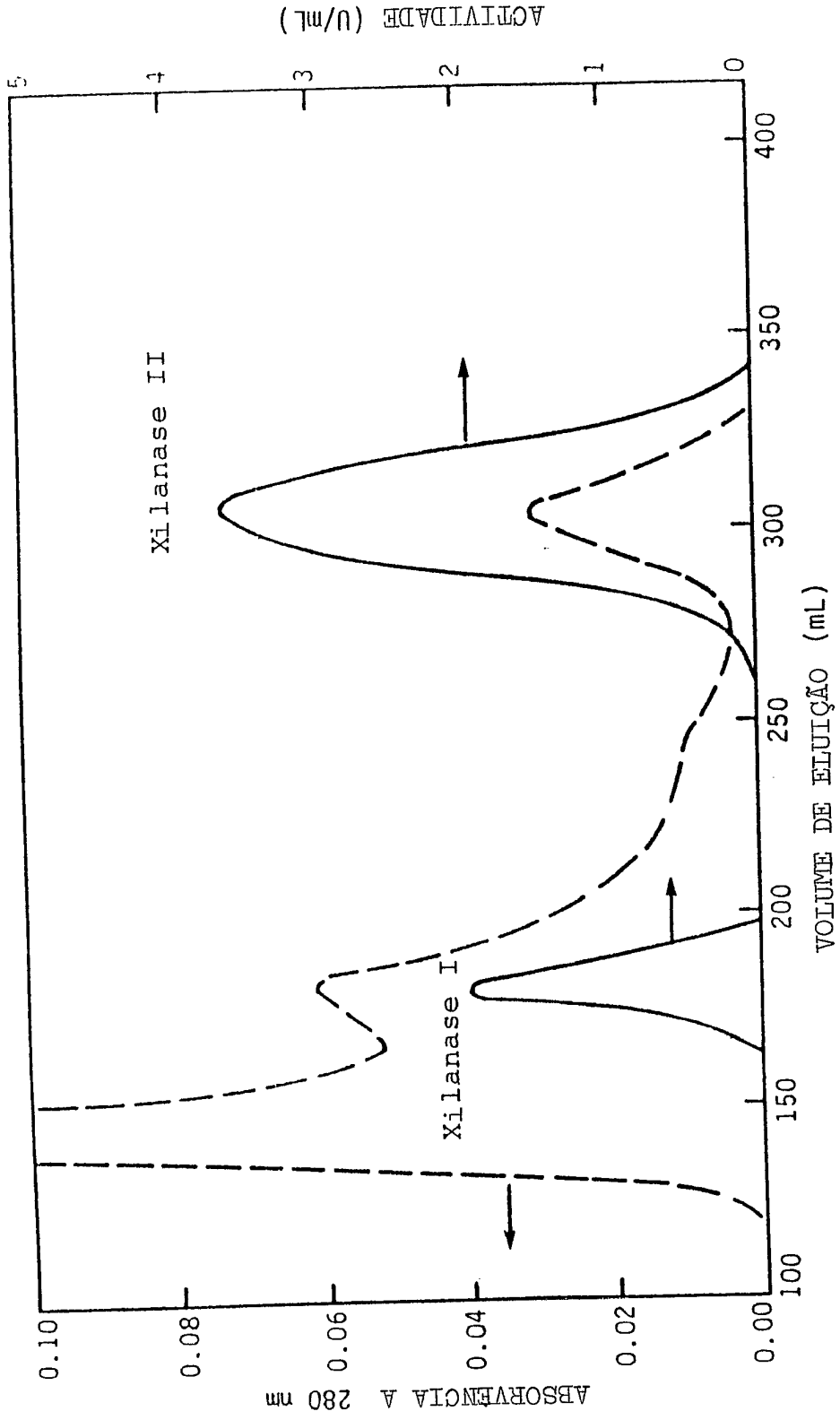


FIG. 2