



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 942**

51 Int. Cl.:

A21D 2/26 (2006.01)

A21D 8/04 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03794720 .7**

96 Fecha de presentación : **11.09.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1549147**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.07.2005**

54

Título: **Utilización de enzimas de la familia 8 con actividad xilanólítica en panificación.**

30

Prioridad: **11.09.2002 US 410345 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.06.2011

73

Titular/es:
PURATOS NAAMLOZE VENNOOTSCHAP
Industrialaan 25
1702 Groot-Bijgaarden, BE

72

Inventor/es: **Dutron, Agnès;**
Georis, Jacques;
Genot, Bernard;
Dauvrin, Thierry;
Collins, Tony;
Hoyoux, Anne y
Feller, Georges

74

Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 360 942 T3

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

DESCRIPCIÓN

Utilización de enzimas de la familia 8 con actividad xilanolítica en panificación.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento y a una composición para la mejora de los productos de panificación que comprenden por lo menos una enzima con actividad xilanolítica procedente de la familia 8 de glucósido oxidasa. En una forma de realización de la invención, dicha enzima con actividad xilanolítica se caracteriza además por el hecho de que existe una inversión de configuración durante la hidrólisis. En las formas de realización específicas de la invención dicha enzima con actividad xilanolítica es una xilanasas psicrófila procedente de *Pseudoalteromonas haloplanktis* o una xilanasas mesófila procedente de *Bacillus halodurans*.

15 **Antecedentes de la invención**

Los xilanos son heteropolisacáridos que forman la mayor parte de la hemicelulosa presente en la biomasa vegetal. El eje central de estos polisacáridos es una cadena de restos de xilopiranosilo unidos por β 1-4. Muchos grupos laterales diferentes se podrían unir a estos restos, tales como los restos de acetilo, arabinosilo y glucuronosilo. Los compuestos fenólicos, como por ejemplo los ácidos ferúlico o hidroxycinnámico están implicados también mediante enlace éster en la reticulación de las cadenas de xilano o por ejemplo, en el enlace entre el xilano y las cadenas de lignina.

La endoxilanasas (o endo- β -1,4-xilanasas) hidrolizan específicamente el eje central de la hemicelulosa. En algunos casos, los grupos laterales pueden enmascarar la cadena principal mediante impedimento estérico. Se han descrito diferentes actividades de las xilanasas. Su especificidad hacia su sustrato varía de una a otra. Algunas son más activas en los arabinoxilanos insolubles. La longitud de los oligómeros producidos depende también del tipo de xilanasas considerado.

Las glucósido hidrolasas (conocidas anteriormente como familia D de celulasas) se han clasificado en 91 familias (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>) basándose en las homologías de secuencia, las características estructurales y mecánicas. Debido a que el plegamiento de las proteínas se conserva mejor que sus secuencias, algunas de las familias se pueden agrupar en "clanes" (Henrissat B. 1991, Biochem. J. Vol. 280, p 309). Las endo-beta-1,4-xilanasas se clasifican generalmente en las familias 10 (anteriormente familia F) y 11 (anteriormente familia G) y se observa que frecuentemente presentan una relación inversa entre su pl y el peso molecular. Las xilanasas de la familia 10 (EXs10) son mayores, más complejas, mientras que las xilanasas de la familia 11 (EXs11) son más pequeñas. Además existe una diferencia significativa en la estructura y en las propiedades catalíticas de ambas familias. EXs10 presenta un plegamiento de (α/β) 8 en barrilete, tiene aproximadamente el 40% de estructura de la hélice α y pertenece al clan GH-A (Domínguez *et al.*, 1995, *Nat. Struct. Biol.* Vol. 2, pág. 569) mientras que EXs11 presenta una conformación de plegamiento de gelatina β , presenta aproximadamente de 3 al 5% de estructuras de la hélice α y pertenece al clan GH-C (Törrönen *et al.*, 1994, *EMBO J.* Vol. 13, pág. 2498). EXs10 posee un punto de enlace al sustrato más pequeño y una especificidad menor para el sustrato, presenta frecuentemente actividad de endoglucanasa y producen oligosacáridos más pequeños en comparación con EXs11, que poseen una afinidad mayor para el xilano no sustituido (Biely *et al.*, 1997, *J. Biotechnol.* Vol. 57, pág. 151). Todas las xilanasas de ambas familias caracterizadas hasta la fecha conservan la configuración anomérica del oxígeno glucosídico tras la hidrólisis en la cual dos glutamatos funcionan como restos catalíticos (Jeffries, 1997, *Curr. Opin. Biotechnol.* Vol. 7, pág. 337).

Las xilanasas se utilizan en varias áreas industriales tales como en las industrias de la pulpa, papel, alimentación y panificación. Otras aplicaciones se sitúan en los sectores de los zumos y de la cerveza. Las xilanasas podrían utilizarse en los procesos de separación del trigo. Los efectos tecnológicos observados son, entre otros, la capacidad de blanqueo de la pulpa mejorada, la disminución de la viscosidad de la alimentación o de los cambios en las características de la masa.

La utilización de las xilanasas (denominadas también hemicelulasas o pentosanasas) en panificación es bien conocida desde hace muchos años. Las enzimas de acondicionamiento de la masa pueden mejorar la maquinabilidad y estabilidad de la masa así como las burbujas en el horno y la estructura de la miga. Otros efectos de los enzimas son un mayor volumen de la barra y una miga más blanda.

El mecanismo de acción de las xilanasas en la preparación del pan todavía no está elucidado claramente. Existen aproximadamente 3 a 4% de pentosanos en la harina de trigo. Estos pentosanos pueden absorber grandes cantidades de agua (hasta 30%). Esta absorción de agua contribuye a las propiedades de la masa así como a la calidad del producto final. La hidrólisis parcial de los pentosanos por las pentosanasas en los oligosacáridos de cadena corta solubles en agua aumenta la capacidad de fijación del agua. Existe también una interacción fuerte de los pentosanos con la fracción del gluten de la harina para formar una red. Las pentosanasas pueden ayudar a relajar esta red fuerte y rígida y permitir, por lo tanto, que el dióxido de carbono formado por la levadura expanda mejor la masa.

Muchos tipos de preparaciones de hemicelulosa se han utilizado como ingredientes activos de panificación y están disponibles en el comercio. Se producen mediante fermentación microbiana utilizando varios microorganismos como

fuentes de enzimas. Algunas de estas enzimas son producidas también por microorganismos modificados genéticamente. Todas las utilizaciones documentadas de las xilanasas que presentan un efecto positivo sobre el volumen específico de los productos panificados, se refieren a las xilanasas pertenecientes a la familia 10 o la familia 11 de las glucósido hidrolasas tal como se definió anteriormente.

Ejemplos de xilanasas para panificación son las xilanasas procedentes de *Bacillus Subtilis* y *Aspergillus niger*.

Existe una variedad de procedimientos para evaluar la actividad de la xilanasas en una preparación enzimática. Ejemplos de dichos procedimientos de determinación de la actividad de la xilanasas son la medición de la liberación de azúcar reductor del xilano (Miller G.L. 1959, Anal. Chem. Vol. 31, pág. 426) o la medición de la liberación de compuestos coloreados de los substratos modificados (por ejemplo AzoWAX o Xylazyme AX de Megazyme). Sin embargo no se pudo encontrar ninguna correlación directa entre la actividad xilanólítica observada en varias preparaciones enzimáticas y el efecto en la panificación. Se pueden observar hasta un cierto punto resultados relacionados con la dosis para una sola enzima pero la misma dosis para dos xilanasas de diferentes orígenes no dan el mismo resultado en la masa o en el pan. Varias razones podrían explicar esto: las diferencias en la especificidad del substrato, las diferencias en las temperaturas y el pH óptimo,...

Es de gran interés desarrollar nuevas preparaciones enzimáticas, tales como composiciones o agentes mejoradores del pan, con propiedades nuevas o mejoradas. Una de estas propiedades podría ser que la fracción de xilanasas sea tan pequeña como sea posible (desde el punto de vista del peso de las enzimas necesario para obtener un determinado resultado en panificación).

Recientemente se ha descrito una xilanasas de la bacteria antártica *Pseudoalteromonas haloplanktis* (Collins, T. *et al.* 2002. A novel Family 8 xylanase: functional and physico-chemical characterisation. *J. Biol. Chem.* Vol. 277.38, pág. 35133; Collins, T. *et al.* 2003, Activity, stability and flexibility in glycosidases adapted to extreme thermal environments. *J. Mol. Biol.* Vol. 328, pág. 419; Van Petegem F. *et al.*, 2002. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a xylanase from the psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* Vol. 58 (Pt. 9), pág. 1494-6). Esta enzima es una enzima psicrófila típica y presenta una gran actividad catalítica a baja temperatura. No es homóloga de las xilanasas de la familia 10 u 11 pero presenta 20 a 30% de identidad con los miembros de la familia 8 de las glucósido hidrolasas (anteriormente familia D), familia que comprende principalmente las endoglucanasas pero también las liquenasas y las quitosanasas. Además, una FingerPRINTScan contra PRINTS utilizando el programa de investigación InterPro Scan (Zdobnov y Apweiler, 2001, Bioinformatics Vol. 17, pág. 847) indicó que la secuencia aislada contenía la huella digital de la familia 8 de las glucosil hidrolasas y restos de la familia 8 que están estrictamente conservados en 20 enzimas de la familia 8 analizadas.

Al contrario de lo que ocurre con EXs10 y EXs11, esta xilanasas de la familia 8 (EXs8) tiene elevado tanto el pH como el peso molecular. Las propiedades estructurales y catalíticas son diferentes a las de ambas EXs10 y EXs11. EXs8 presenta un plegamiento (α/α)₆ en barrilete con 13 hélices α y 13 cadenas β y pertenece al clan GH-M (Van Petegem *et al.*, 2003, The structure of a cold-adapted family 8 xylanase at 1.3 Å resolution. Structural adaptations to cold and investigation of the active site. *J. Biol. Chem.* Vol. 278(9), pág. 7531-9). Estas enzimas no presentan actividad de endoglucanasa, quitosanasas o liqueninasa y parecen ser operativamente similares a EXs11, siendo más activas en los xilo-oligosacáridos de cadena larga.

En contraste con otras EXs10 y EXs11 conocidas que conservan la configuración, las gluco-hidrolasas de la familia 8 (Fierobe *et al.*, 1993. *Eur. J. Biochem.* Vol. 217, pág. 557; <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>) tienden a hidrolizar el substrato por inversión de la configuración anómera del oxígeno glucosílico tras la hidrólisis en la que un glutamato y un aspartato funcionan como restos catalíticos. Esto se ha demostrado, por ejemplo, para la xilanasas psicrófila del *Pseudoalteromonas haloplanktis* (Van Petegem *et al.*, 2003, *J. Biol. Chem.*, Vol. 278(9), pág. 7531-9; Collins, T. *et al.* 2002. A novel family 8 xylanase: functional and physico-chemical characterization. *J. Biol. Chem.* Vol. 277 (38), pág. 35133).

Otras xilanasas que pertenecen a la familia 8 de las glucósido hidrolasas han sido ya descritas (Yoon, K-H., 1998, Molecular cloning of a *Bacillus sp.* KK-1 xylanase gene and characterization of the gen product. *Biochem. Mol. Biol. International.* 45(2), pág. 337; *Bacillus halodurans* C-125 xylanase Y GenBank/GenPept™ accession code BAB05824). Estas xilanasas presentan homologías de secuencia entre ellas así como con la xilanasas de *Pseudoalteromonas haloplanktis* tal como describe Collins *et al.* (2002, véase anteriormente).

La lista de las enzimas que pertenecen a la familia 8 de las glucósido hidrolasas se actualiza regularmente (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>).

Objetivos de la invención

La presente invención tiene por objetivo proporcionar nuevas preparaciones enzimáticas tales como composiciones mejoradoras del pan.

La presente invención tiene por objetivo además proporcionar un nuevo procedimiento para la obtención de productos de panificación mejorados utilizando dichas preparaciones enzimáticas.

Sumario de la invención

- 5 Se descubrió sorprendentemente que una enzima con actividad xilanolítica y perteneciente a la familia 8 de las glucósido hidrolasas presentaba un efecto positivo en las propiedades de la masa o en las propiedades del producto panificado cuando se añadía durante el mezclado de la masa.
- 10 Se descubrió asimismo de forma sorprendente que una enzima con actividad de xilanasa y que se hidroliza con inversión de la configuración anómera presentaba un efecto positivo en las propiedades de la masa o en las propiedades de los productos panificados cuando se añadía durante el mezclado de la masa.
- 15 Se descubrió además de forma sorprendente que la utilización de enzimas, tal como se describió anteriormente, aumenta el volumen de la barra.
- 20 Se descubrió asimismo que la utilización de algunas de dichas enzimas con actividad xilanolítica de la familia 8 de las glucósido hidrolasas, la EXs8, permite utilizar menos enzimas para el mismo efecto en las propiedades de la masa del pan en comparación con las xilanasas conocidas actualmente.
- 25 Una forma de realización específica de la presente invención se refiere a las enzimas con actividad xilanolítica de la familia 8 de las glucósido hidrolasas y a su utilización en la industria de panificación, tal como se describió anteriormente.
- Una forma de realización particular de la invención se refiere a la xilanasa de la familia 8 psicrófila de la *Pseudoalteromonas haloplanktis* y a una xilanasa Y mesófila de la familia 8 de *Bacillus halodurans*. Estas enzimas son xilanasas que hidrolizan con inversión de la configuración anomérica.
- 30 Las xilanasas preferidas son las obtenidas a partir de las cepas TAH3a de *Pseudoalteromonas haloplanktis* y C-125 de *Bacillus halodurans* o las obtenidas a partir del gen correspondiente expresados en un anfitrión adecuado.
- Preferentemente, la composición mejoradora del pan que comprende por lo menos una enzima de la invención, se añade durante el mezclado de la masa.
- 35 Dicha composición mejoradora del pan puede comprender además otros agentes mejoradores del pan seleccionados de la lista constituida por otras enzimas, emulsionantes, oxidantes, leche en polvo, grasas, azúcares, aminoácidos, sales, proteínas (gluten, puntos de unión a la celulosa) o una mezcla de los mismos.
- 40 Dichas otras enzimas se pueden seleccionar de la lista constituida por alfa-amilasas, beta-amilasas, amilasas maltógenas, otras xilanasas, proteasas, glucosa oxidasas, óxido-reductasas, gluconasas, celulasas, transglutaminasas, isomerasas, lipasas, fosfolipasas, pectinasas o una mezcla de las mismas.
- Dicha alfa-amilasa se obtiene preferentemente a partir de *Aspergillus oryzae*.
- 45 Las enzimas con actividad xilanolítica según la invención se pueden utilizar en forma de extracto celular, extracto exento de células o como proteína purificada en dicha composición mejoradora del pan.
- Las enzimas de la invención se pueden mezclar con otros ingredientes y se pueden utilizar en forma de polvo seco o granulado, en particular de un granulado no pulverulento o en forma de líquido, preferentemente con uno o más estabilizante(s) como por ejemplo polioles, azúcares, ácidos orgánicos o alcoholes de azúcar.
- 50 Otro aspecto de la invención se refiere a los productos panificados obtenidos o que se pueden obtener utilizando una enzima de la invención.
- 55 Otro aspecto de la invención se refiere a las composiciones mejoradoras del pan que comprenden por lo menos una de las enzimas de la invención.
- Otro aspecto adicional de la invención se refiere a un procedimiento para aumentar el volumen de la barra de un producto panificado, que comprende la etapa de adición durante el mezclado de la masa de dicho producto panificado, de una cantidad suficiente de una enzima con actividad xilanolítica seleccionada de entre el grupo constituido por las xilanasas de la familia 8 de la glicósido hidrolasa, posiblemente enzimas con actividad xilanolítica que hidrolizan con inversión de la configuración. Es posible utilizar cualquier combinación o mezcla de las enzimas descritas anteriormente en una masa o producto de panadería para cualquiera de los fines descritos anteriormente.

65

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa el efecto de las cantidades crecientes de TAH3a de xilanasa de *Pseudoalteromonas haloplanktis* en el volumen de los panecillos de Bélgica duros.

La Figura 2 presenta una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de varias muestras de xilanasa (cantidad de enzima cargada proporcional a la cantidad utilizada en la panificación, el mismo factor de proporcionalidad para todas las enzimas).

Banda 1: marcadores del peso molecular.

Bandas 2 a 5: cantidades de xilanasa de *Pseudoalteromonas haloplanktis* (2 a 3) y xilanasa de *Bacillus subtilis* (4 a 5) necesarias para tratar respectivamente 0,333 (2, 4) y 0,166 kg (3, 5) de harina de trigo.

Las figuras 3A y B representan la secuencia de nucleótidos del gel de xilanasa de *Pseudoalteromonas haloplanktis* (A) y la correspondiente xilanasa (B).

La figura 4 representa la xilanasa Y de la cepa C-125 de *Bacillus halodurans*.

La invención se describirá con más detalle en los siguientes ejemplos y formas de realización con referencia a los dibujos adjuntos. Las formas de realización y ejemplos particulares no pretenden de ningún modo limitar el alcance reivindicado de la invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere en particular a la utilización de las enzimas de la familia 8 con actividad xilanolítica en panificación para mejorar entre otros el volumen de la barra. Dichas enzimas pueden presentar otras actividades, pero la actividad xilanolítica debe ser tal que la enzima sea apropiada para los fines de la presente invención.

A. Preparación de algunas enzimas preferidas según la invención

Las enzimas con actividad xilanolítica de la familia 8 de las glucosil hidrolasas se puede obtener de varias procedencias (véase p. ej. <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/> para una visión general). Algunas de las enzimas se han descrito en la bibliografía científica y por lo tanto pueden obtenerse utilizando las técnicas descritas en las correspondientes publicaciones. A continuación, se describe con más detalle la preparación de algunas enzimas preferidas según la invención.

A.1. Xilanasa de TAH3a de *Pseudoalteromonas haloplanktis*

La xilanasa de TAH3a de *Pseudoalteromonas haloplanktis* ha sido descrita en Collins T. *et al.* (2002. *A novel Family 8 xylanase: functional and physico-chemical characterisation. J. Biol. Chem.* Vol. 277(38), pág. 35133). Collins *et al.* describe la preparación mediante cultivo líquido de una cepa recombinante de *Escherichia coli* que lleva el gen de xilanasa de TAH3a de *Pseudoalteromonas haloplanktis* clonado en un plásmido de expresión.

La secuencia de nucleótidos del gen de xilanasa de *Pseudoalteromonas haloplanktis* está disponible, así como está disponible la correspondiente secuencia de aminoácidos (EMBL número de registro AJ427921, secuencia incluida en esta memoria como referencia, Figuras 3A a B, SEC. ID n°: 6-7). La enzima tiene un peso molecular de 46.000 Da, un punto isoeléctrico de aproximadamente 9,5, una temperatura óptima de 35°C y un pH óptimo entre 5,3 y 8. Es una auténtica xilanasa, siendo los productos principales de la reacción de hidrólisis del xilano la xilotriosa y la xilotetraosa tras incubación prolongada.

La preparación en bruto o purificada de esta xilanasa se puede obtener en primer lugar cultivando cualquier tipo natural de la cepa recombinante en un medio adecuado para expresar finalmente la enzima seguido de una o varias etapas de purificación como por ejemplo, pero sin limitarse a, centrifugación, disgregación celular, microfiltración, ultrafiltración, precipitación, cromatografía líquida, liofilización,...

A.2. Xilanasa Y de C-125 de *Bacillus halodurans*

La secuencia de la xilanasa Y de la familia 8 de la cepa C-125 de *Bacillus halodurans* (ATCCCBAA-125) está disponible como código de registro BAB05824 en el GenBank/GenPept™ (secuencia incluida como referencia en esta memoria, Figura 4, SEC. ID n°: 8). La secuencia de ADN correspondiente está disponible como parte de la secuencia completa del genoma de la cepa C-125 de *Bacillus halodurans* (código de registro AP001514, secuencia incluida como referencia en esta memoria).

La xilanasa de la cepa C-125 de *Bacillus halodurans* se puede obtener cultivando en primer lugar la cepa recombinante en/sobre un medio adecuado para expresar finalmente la xilanasa seguido de una o varias etapas de

purificación como por ejemplo, pero sin limitarse a, centrifugación, disgregación celular, microfiltración, ultrafiltración, precipitación, cromatografía líquida, liofilización,...

5 Como alternativa, la xilanasas de C-125 de *Bacillus halodurans* se puede obtener en primer lugar clonando el correspondiente gen utilizando técnicas muy conocidas tales como la amplificación por PCR, la ligadura a un vector y la transformación en un anfitrión microbiano. Tras esta etapa, la xilanasas se puede expresar de manera ventajosa en un anfitrión adecuado colocando el gen bajo el control de las secuencias de control apropiadas tales como, pero sin restringirse al activador y terminador e insertando esta creación de ADN en una célula lo que permitiría la expresión del gen.

10 En una forma de realización específica de la presente invención el gen de xilanasas se sobreexpresará en dicha célula.

15 La presente invención, sin embargo no está restringida a las enzimas anteriores sino que se extiende a otras enzimas con actividad xilanolítica que pertenecen a la familia 8 de las glucosidasas hidrolasas. Estas enzimas son producidas por células microbianas y no microbianas vivas tales como, pero sin restringirse a, plantas o animales. Las enzimas se pueden obtener directamente a partir de cultivos de células vivas y/o de muestras, o pueden ser producidas por cepas recombinantes o células anfitrionas. El gen que codifica la enzima de interés puede ser un gen sintético.

20 "Cepa recombinante" o "célula anfitriona recombinante" significa una cepa que tiene incorporada la secuencia de nucleótidos de dichas enzimas con actividad xilanolítica que pertenece a la familia 8 de las glucosidasas hidrolasas.

Las células anfitrión recombinantes se seleccionan de manera ventajosa de entre el grupo constituido por el mundo microbiano, preferentemente bacterias u hongos, incluyendo levaduras y más preferentemente *Bacillus*.

25 Preferentemente, dicha cepa recombinante es capaz de sobreexpresar dicha secuencia de nucleótidos y permite de manera ventajosa una gran producción de dicha xilanasas.

30 Las enzimas con actividad xilanolítica producidas según la presente invención se pueden utilizar directamente para los fines de dicha presente invención y/o pueden experimentar una o más purificaciones o (además) etapas de cultivo. En una particular forma de realización de la invención, las enzimas se pueden utilizar en forma pura.

35 Los métodos posibles de preparación para las enzimas según la invención incluyen entre otros la preparación o purificación a partir de cultivos de microorganismos, recombinantes o no, en matraces de agitación o en fermentadores, la preparación o purificación a partir de cultivos inmovilizados, la extracción y/o purificación a partir de células vivas (plantas,...),

B. Aplicación de la enzima

40 La enzima con actividad xilanolítica según la presente invención, purificada o no purificada, es particularmente apropiada como agente mejorador del pan. Los agentes mejoradores del pan son productos que podrían mejorar o aumentar la textura, sabor, efectos de anti-endurecimiento, suavidad, suavidad de la miga al almacenamiento, frescura, maquinabilidad de la masa, volumen del producto final. Preferentemente dicha enzima con actividad xilanolítica mejora la manipulación de la masa y/o aumenta el volumen específico del producto final panificado. "Producto panificado" significa la inclusión de cualquier producto preparado a partir de la masa, en particular una levadura que levanta el producto panificado. La masa se obtiene con cualquier tipo harina (p. ej. basada en trigo, centeno, cebada, avena o maíz). Preferentemente la masa se prepara con trigo o con mezclas que incluyen el trigo.

50 Un aspecto de la presente invención consiste en demostrar que las enzimas con actividad xilanolítica que pertenecen a la familia 8 podrían utilizarse con ventajas en una fórmula mejoradora del pan.

En una forma de realización adicional de la presente invención, se demuestra que una enzima con actividad xilanolítica que pertenece a la familia 8 de las glucosidasas hidrolasas aumenta el volumen de la barra de un producto panificado.

55 En otra forma de realización de la presente invención, se demuestra que la cantidad de una enzima de la familia 8 con actividad xilanolítica necesaria para obtener un resultado determinado en la panificación es excepcionalmente menor que la cantidad generalmente utilizada cuando se trabaja con enzimas disponibles en el comercio.

60 En otro aspecto, la presente invención se refiere al efecto aditivo de dicha enzima con actividad xilanolítica con otras enzimas, en particular con una alfa-amilasa, preferentemente una alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*. Dicha enzima con actividad xilanolítica se puede utilizar en combinación con otros agentes mejoradores del pan como, pero no limitados a, enzimas, emulsionantes, oxidantes, leche en polvo, grasas, azúcares, aminoácidos, sales, proteínas (gluten, puntos de unión a la celulosa) siendo bien conocidos dichos agentes mejoradores por los expertos en la materia. Ejemplos de enzimas son, pero no se limitan a, alfa-amilasas, beta-amilasas, amilasas maltógenas, xilanasas, proteasas, glucosa oxidasas, óxido-reductasas, glucanasas, celulasas, transglutaminasas, isomerasas, lipasas, fosfolipasas, pectinasas, etc.

La enzima con actividad xilanólítica según la presente invención se puede utilizar bajo varias formas. Las células que expresan la enzima, tales como levaduras, hongos, bacteria *Archea* o bacterias, se puede utilizar directamente en el proceso. Dicha enzima se puede utilizar como un extracto celular, un extracto exento de células (es decir fracciones de la célula anfitrión que se han sometido a una o más etapas de disgregación, centrifugación y/o extracción) o como proteína purificada. Cualquiera de las formas descritas anteriormente se puede utilizar en combinación con otra enzima bajo cualquiera de las formas descritas anteriormente. Dichas células, extractos celulares, extractos exentos de células o enzima se pueden mezclar con diferentes ingredientes, p. ej. en forma de polvo seco o granulado, en particular un granulado no en polvo, en forma de líquido, por ejemplo con estabilizantes tales como polioles, azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes de azúcar según los procedimientos establecidos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de la xilanasa de TAH3a de *Pseudoalteromonas haloplanktis*

Se obtuvo la xilanasa de *Pseudoalteromonas haloplanktis* como describe (Collins *et al.*, 2002, véase anteriormente) a partir de un cultivo líquido de una cepa recombinante de *Escherichia coli* transformada con un vector de ADN que contiene el gen correspondiente.

Ejemplo 2: Preparación de la xilanasa de C-125 de *Bacillus halodurans*

Cepa bacteriana y condiciones de cultivo

Se cultivó C-125 de *Bacillus halodurans* (ATCC BAA-125) en medio alcalino de *Bacillus* (10 g/l de glucosa, 5 g/l de extracto de levadura (Difco), 10 g/l de Bacto Tryptone (Difco), 1 g/l de K₂HPO₄, 0,2 g/l de MgSO₄, 10 g/l de Na₂CO₃) enriquecido con 10 g/l de xilano de abedul (Sigma) durante 72 horas a 37°C. Tras la centrifugación durante 1 h a 18.000 g y 4°C, se concentró el sobrenadante por precipitación con sulfato de amonio al 80% y se volvió a poner en suspensión en MOPS 20 mM a pH 8,0. Esta fracción representa la fracción del extracto en bruto que se utilizará en las pruebas de panificación.

Clonación y sobreexpresión del gen Y de xilanasa

Se extrajo ADN genómico y se purificó a partir de cultivos de 16 horas, se cultivó a 37°C en el medio alcalino de *Bacillus* modificado descrito anteriormente, con el kit de purificación de ADN genómico de Wizard® (Promega). Basándose en la secuencia publicada (registro AP001514 de GenBank/GenPept™) el gen Y completo de xilanasa se amplificó por PCR utilizando VENT polimerasa (Biolabs Inc, Beverly, MA, USA) con el cebador de la cadena transcrita 5'-GGGCATATGAAGAAAACGACAGAAGG TG-3', SEC. ID n°: 1 que contiene una zona *Nde* I (subrayada) y con el cebador de la cadena complementaria 5'-GGCTCGAGCTAG TGTTCTCTTCTTG-3', SEQ. ID n°: 2 que contiene una zona *Xho* I (subrayada) y el codón de terminación (en cursivas).

Tras los 3 min de desnaturalización inicial a 95°C, se realizaron 25 ciclos de amplificación utilizando un aparato Progenel (Techne Cambridge, Reino Unido). Cada ciclo incluía la desnaturalización a 95°C durante 1 min, hibridación a 52°C durante 30 s y alargamiento a 72°C durante 1,5 min.

Se clonó el producto por PCR en un vector PCRScript Amp SK(+) (Stratagene), utilizando el procedimiento recomendado por el suministrador, y para transformar se utilizaron las células Kan ultracompetentes de Epicurian Coli XL10-Gold®. La selección azul-blanca permitió la selección de colonias blancas que llevan el fragmento de la PCR. La preparación del plásmido purificado (plásmido Nucleospin, Macherey-Nagel) se secuenció en un secuenciador de ADN de ALF (Pharmacia Biotech). Se realizó el secuenciado del fragmento insertado utilizando los cebadores universales T7 y RP así como los siguientes cebadores:

5'-GTGCGGACTGAAGGAATGTC-3', SEC. ID n°: 3
 5'-GTATGGTCCATCAACAGAGG-3', SEC. ID n°: 4
 5'-GATGGCACTAAAACTCCTGG-3', SEC. ID n°: 5

La secuencia obtenida fue idéntica a la secuencia publicada que se podía recuperar del GenBank/genPept™ con el número de registro AP001514.

El gen Y de xilanasa se clonó por consiguiente en el PCRScript Amp SK(+) se escindió a continuación con *Nde* I y *Xho* I y se ligó al vector de clonación pET 22b(+) (Novagen). El plásmido recombinante resultante se clonó en células BL21 (DE3) de *E. coli* (Stratagene).

Producción de xilanasa Y de la familia 8 recombinante a partir de C-125 de *Bacillus halodurans*.

Se centrifugaron a 10.000 g durante 1 minuto quince ml de un precultivo de cinco horas (37°C) de las células BL21 (DE3) de *E. coli* que llevan el gen de xilanasa y el sedimento se volvió a poner en suspensión en 900 ml de caldo de cultivo Terrific (12 g/l de Bacto tryptone (Difco), 24 g/l de extracto de levadura (Difco), 4 ml/l de glicerol, 12,54 g/l de

5 K_2HPO_4 , 2,31 g/l de KH_2PO_4) que contenía 200 µg/ml de ampicilina en un matraz de agitación de 3 litros. Se incubó el cultivo a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una absorbancia a 550 nm de entre 3 y 4 con lo cual se produjo la expresión de la enzima con isopropil-1-tio-β-galactopiranosido 1 mM. Tras 15 horas más de incubación a 37°C se recogieron las células por centrifugación a 18.000 g durante 30 minutos a 4°C, se volvieron a poner en suspensión en BICINE 50 mM que contenía NaCl 10 mM, disgregado en un disgregador de células preenfriado (Constant Systems Ltd., Warwick, Reino Unido) a 28 Kpsi y se centrifugó a 40.000 g durante 30 minutos.

Producción de xilanasa de la familia 8 de C-125 de *Bacillus halodurans* recombinante.

10 Se recogieron por centrifugación a 10.000 g durante 1 minuto las células de un precultivo de cinco horas (37°C) de las células BL21 (DE3) de *E. coli* que llevan el gen de xilanasa y se utilizaron para inocular cinco litros (15 ml de pre-cultivo por litro de cultivo) de caldo de cultivo Terrific (12 g/l de Bacto tryptone (Difco), 24 g/l de extracto de levadura (Difco), 4 ml/l de glicerol, 12,54 g/l de K_2HPO_4 , 2,31 g/l de KH_2PO_4) que contenía 200 µg/ml de ampicilina. Se incubó el cultivo a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una absorbancia a 550 nm de entre 3 y 4 con lo cual se produjo la expresión de la enzima con isopropil-1-tio-β-galactopiranosido 1 mM. Tras 4 horas más de incubación a 37°C se recogieron las células por centrifugación a 18.000 g durante 20 minutos a 4°C, se volvieron a poner en suspensión en MOPS 20 mM (Sigma), se disgregaron en un disgregador de células preenfriado (Constant Systems Ltd.) a 28 Kpsi y se centrifugó a 40.000 g durante 30 minutos. El ADN cromosómico se eliminó por tratamiento con sulfato de protamina al 0,2% (Calbiochem) y centrifugación a 40.000 g durante 30 minutos. Se añadieron a continuación 25 unidades de benzonasa (Merck, Darmstadt, Alemania) y se utilizó la solución en las pruebas de panificación.

Ejemplo 3: Efecto de la xilanasa de TAH3a de *Pseudoalteromonas haloplanktis* en la panificación de panecillos belgas duros

25 Se realizaron pruebas de panificación para demostrar el efecto positivo de la xilanasa de TAH3a de *Pseudoalteromonas haloplanktis* en panificación. Se evaluó el efecto positivo por el aumento en el volumen del pan comparado con una referencia que no contenía esta enzima.

30 Se probó la xilanasa en panecillos belgas duros que se producen a gran escala cada día en Bélgica. El procedimiento descrito es bien conocido por el panadero con experiencia y es obvio que un experto en la materia puede obtener los mismos resultados utilizando un equipo de otros proveedores.

Los ingredientes utilizados se enumeran en la Tabla 1 a continuación:

35 Tabla 1

Ingredientes (g)	RECETA 1	RECETA 2	RECETA 3	RECETA 4	RECETA 5
Harina (Surbi Molens van Deinze)	1500	1500	1500	1500	1500
Agua	915	915	915	915	915
Levadura fresca (Bruggeman-Bélgica)	90	90	90	90	90
Cloruro de sodio	30	30	30	30	30
Multec Data HP 20 (Beldem-Bélgica)	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9
Ácido ascórbico	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
Xilanasa <i>Pseudoalter. haloplanktis</i> (unidades (1)/100 kg de harina)	0	25	50	100	200

40 (1): Una unidad de xilanasa de *Pseudoalteromonas haloplanktis* se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de azúcar reductor (expresada como xilosa) de xilano de abedul a 30°C y pH 4,5 (procedimiento Nelson-Somogyi)

45 Se mezclaron los ingredientes durante 2 min a baja y 8 min alta velocidad en un mezclador Diosna SP24. La temperatura final de la masa así como las temperaturas en reposo y de prueba fueron de 25°C. Tras el reposo durante 15 min a 25°C, se volvió a trabajar la masa manualmente y se dejó en reposo durante otros 15 min. A continuación, se prepararon 2 kg de piezas de masa y se probaron durante 10 min. Se dividieron las piezas de masa de 2 kg y se prepararon utilizando el Eberhardt Optimat. Se obtuvieron 66 g de piezas de masa redondas. Después de otros 5 min de tiempo de reposo, se cortaron las piezas de masa por presión y se sometieron a una etapa de prueba final durante 70 min. Las piezas de masa se hornearon a 230°C en un horno MIWE Condo™ con vapor (Michael Wenz-Arnstein-Alemania). Se midió el volumen de los 6 panecillos utilizando el procedimiento de desplazamiento de rabina utilizado normalmente.

Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 2:

Tabla 2

Unidades de xilanas	Volumen de los panecillos (ml)
0	2325
25	2675
50	2875
100	2950
200	3100

En la figura 1 se presenta una representación gráfica del efecto de la xilanas.

Estos resultados demuestran que la xilanas de *Pseudoalteromonas haloplanktis* presenta un efecto positivo en el volumen del pan.

Ejemplo 4: Comparación de las cantidades de xilanas utilizadas en panificación

La cantidad relativa de xilanas necesarias para obtener el mismo efecto en el volumen en el ensayo de los panecillos belgas duros descrito en el Ejemplo 3 se ha comparado por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

Las xilanas probadas y sus respectivos niveles de utilización en panificación fueron los siguientes:

- la xilanas de TAH3a de *Pseudoalteromonas haloplanktis* (30 unidades de *P. haloplanktis*/100 kg de harina).
- la xilanas de *Bacillus subtilis* (Belase B210 BELDEM S.A., Bélgica) – 3 g/100 kg de harina.

Las cantidades de enzima correspondientes a la cantidad necesaria para tratar 0,333 kg y 0,166 kg de harina y que producen el mismo aumento de volumen, se cargaron en un gel prefabricado Tris-HCl al 12% para el aparato de electroforesis en SDS-poliacrilamida "Ready Gel" (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) y se introdujeron en un aparato "Mini Protean II" (BIO-RAD) según el procedimiento del fabricante. Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie utilizando el procedimiento habitual.

En la figura 2 se presenta una fotografía del gel teñido.

Se puede sacar la conclusión de esta fotografía que la cantidad de xilanas procedente de TAH3a de *Pseudoalteromonas haloplanktis* necesaria en la panificación es significativamente menor en comparación con la otra.

Ejemplo 5: Efecto de la xilanas de TAH3a de *Pseudoalteromonas haloplanktis* en panes argentinos

Se realizaron pruebas de panificación para demostrar el efecto positivo de unas xilanas de la familia 8 en la panificación en otra receta distinta de la utilizada en el ejemplo 3, como por ejemplo en barras argentinas. Se evaluó el efecto positivo mediante el aumento en el volumen de pan en comparación con una referencia que no contiene la enzima y mediante la profundidad del corte en la superficie del pan.

Se probaron las enzimas de la invención en panes argentinos que son panes alargados típicos que necesitan tiempo de prueba prolongado (17 horas a 20°C). El procedimiento descrito es bien conocido por el panadero con experiencia y es obvio que un experto en la materia puede obtener los mismos resultados utilizando un equipo de otros proveedores.

Los ingredientes utilizados se enumeran en la Tabla 3 a continuación:

Tabla 3

Ingredientes (g)	RECETA 1	RECETA 2	RECETA 3	RECETA 4
Harina (Surbi Molens van Deinze)	1500	1500	1500	1500
Agua	810	810	810	810
Levadura fresca (Bruggeman-Bélgica)	5,25	5,25	5,25	5,25
Cloruro de sodio	30	30	30	30
Mejorador normal (1) (Puratos-Bélgica)	22,5	22,5	22,5	22,5
Bel'asa B2100 (Beldem – Bélgica) (210 unidades/g)	0	0,15	0	0
Xilanas purificada de TAH3a de <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> (unidades (2)/100 kg de harina)	0	0	25	50

(1): El mejorador normal utilizado contiene: alfa amilasa fúngica (Fungamyl 75.000, Novozymes), 1g/100 kg de harina, 10 g de vitamina C, Azodicarbonamida, 2 g/100 kg de harina. Este es un ejemplo de un mejorador normal. Las cantidades absolutas y relativas de aditivos pueden variar según la adaptación local a la harina de trigo y al procedimiento.

(2): Una unidad de xilanasa se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de azúcar reductor (expresada como xilosa) de xilano de abedul a 30°C y pH 4,5 (procedimiento Nelson-Somogyi)

Se mezclaron los ingredientes durante 2 min a baja y 7 min alta velocidad en un mezclador Diosna SP24. La temperatura final de la masa durante el reposo fue de 25°C mientras que durante la prueba fue de 20°C. Tras el reposo durante 20 min a 25°C, se volvió a trabajar la masa manualmente y se dejó en reposo durante 17 horas a 20°C durante la prueba. A continuación, se prepararon 2 kg de piezas de masa y se probaron durante 10 min. Se dividieron las piezas de masa de 0,35 kg y se prepararon utilizando el Bertrand R8/L8 (\pm 30 cm) y se sometieron a una etapa de prueba final durante 17 horas. Las piezas de masa se hornearon a 210°C durante 30 min. en un horno MIWE Condo™ con vapor (Michael Wenz-Arnstein-Alemania). Se midió el volumen de los panes argentinos utilizando el procedimiento de desplazamiento de rabina utilizado normalmente.

Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 4:

Tabla 4

Receta	Muestra	Unidades de xilanasa	Volumen de pan (ml)	Profundidad de corte (mm)
1		0	1675	19
2	Bel'asa B210	2100	1900	27
3	TAH3a	25	1900	34
4	TAH3a	50	1925	30

Estos resultados demuestran que la xilanasa de la familia 8 presenta un efecto positivo en la preparación del pan en la prueba de larga duración a baja temperatura (es decir, 20°C). La cantidad de enzima comercial (Bel'asa B210, véase anteriormente) utilizada aquí es 3 veces mayor que la dosis óptima requerida descrita en el ejemplo 3 para los panecillos belgas duros, mientras que la cantidad de xilanasa de la familia 8 necesaria permaneció inalterada. Existe también una diferencia entre la concentración de enzima necesaria para optimizar la profundidad del corte y la necesaria para un aumento de volumen óptimo.

Ejemplo 6: Efecto de varias enzimas de la invención frente a otras enzimas en panificación

Se realizaron pruebas de panificación para demostrar el efecto positivo de varias enzimas con actividad xilanolítica pertenecientes a la familia 8 de las glucósido hidrolasas en la panificación. Se evaluó el efecto positivo por el aumento en el volumen de pan en comparación con una referencia que no contiene estas enzimas así como con una preparación enzimática comercial (Bel'asa B210, véase anteriormente).

Se preparó y purificó la xilanasa de TAH3a de *Pseudoalteromonas haloplanktis* como se describe en el ejemplo 1. Se preparó la xilanasa Y de C-125 de *Bacillus halodurans* a partir de una cepa de *Escherichia coli* recombinante como se describe en el ejemplo 2.

El procedimiento utilizado para evaluar los rendimientos de las dos enzimas fue una mini- prueba de panificación consistente en preparar masa con 100 g de harina.

El procedimiento descrito es bien conocido por un expertos en la materia y es obvio que se pueden obtener los mismos resultados utilizando un equipo de otros proveedores.

Los ingredientes utilizados se enumeran en la Tabla 5 a continuación:

Tabla 5

Ingredientes (g)	RECETA 1	RECETA 2	RECETA 3	RECETA 4	RECETA 5	RECETA 6	RECETA 7
Harina (Surbi Molens van Deinze)	100	100	100	100	100	100	100
Agua	57	57	57	57	57	57	57
Levadura fresca (Bruggeman-Bélgica)	5	5	5	5	5	5	5
Cloruro de sodio	2	2	2	2	2	2	2
Dextrosa	2	2	2	2	2	2	2
Ácido ascórbico (unidades (1)/100 kg de harina)	4	4	4	4	4	4	4
Bel'asa B2100 (Beldem – Bélgica) (unidades (1)/100 kg de harina)	0	630	1050	0	0	0	0
Xilanasa purificada de TAH3a de <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> (unidades (1)/100 kg de harina)	0	0	0	25	50	0	0
Xilanasa recombinante de C-125 de <i>Bacillus halodurans</i> (unidades (1)/100 kg de harina)	0	0	0	0	0	6000	12000

5 (1): Una unidad de xilanasa se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de azúcar reductor (expresada como xilosa) de xilano de abedul a 30°C y pH 4,5 (procedimiento Nelson-Somogyi)

10 Se mezclaron los ingredientes durante 4,5 min en un mezclador National. Se pesaron 150 g de piezas de masa y se dejaron en reposo durante 20 min a 25°C en cajas de plástico. Se volvieron a trabajar las masas y se dejaron en reposo durante otros 20 min. El tiempo de prueba final fue de 50 min a 36°C. Las piezas de masa se hornearon a continuación a 225°C durante 20 min. Se midió el volumen de los panes utilizando el procedimiento de desplazamiento de rábana utilizado normalmente.

Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 6:

15 Tabla 6

Receta	Muestra	Unidades de xilanasa/100 kg de harina	Volumen de pan (ml)
1		0	650
2	Bel'asa B210	630	680
3	Bel'asa B210	1050	705
4	TAH3a	25	690
5	TAH3a	50	760
6	C-125	6000	725
7	C-125	12000	725

20 Estos resultados demuestran que el efecto positivo de las enzimas de la invención no está restringido a la xilanasa de TAH3a de *Pseudoalteromonas haloplanktis*. Además otras preparaciones enzimáticas con actividad xilanólítica que pertenecen a la familia 8 de la glucósido hidrolasa podrían mejorar las propiedades del pan (demostradas en la presente memoria para la xilanasa de C-125 de *Bacillus halodurans*, otros resultados no mostrados).

Listado de secuencias

25 <110> PURATOS N.V.

<120> Uso de enzimas de familia 8 con actividad xilanólítica durante la panificación

<130> P. PURA.19/WO

30

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.2

5	<210> 1 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador sentido	
10	<400> 1 gggcatatga agaaaacgac agaagggtg	28
15	<210> 2 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador antisentido	
	<400> 2 ggctcgagct agtgtctc ttcttg	26
25	<210> 3 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador de secuenciación	
	<400> 3 gtgcggactg aaggaatgc	20
35	<210> 4 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> cebador de secuenciación	
45	<400> 4 gtatgtcca tcaacagagg	20
50	<210> 5 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador de secuenciación	
55	<400> 5 gatggcacta aaaactcctg g	21
60	<210> 6 <211> 1281 <212> ADN <213> <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	
	<220> <221> otras características	

<223> gen de xilanasa de *Pseudoalteromonas haloplanktis* (número de acceso EMBL AJ427921)

<400> 6

```

atgaaagtat tttttaaagt aacaacttta ttgttaatac taataagcta tcaatcactt    60
gctgcattta ataataaccc atcgagtgta ggcgcctaca gttcagggac ataccgtaac    120
ctcgcacaaag aaatgggtaa aacaaatata cagcaaaagg tgaatagtac ttttgacaat    180
atgtttggct ataacaacac acaacaactt tactaccggt acaccgaaaa cggtgtttat    240
aaagcacact acataaaagc aattaaccca gacgaaggcg acgatataag aacagaaggg    300
caatcggtggg gaatgaccgc cgctgtcatg ctttaataac aagaagaatt tgataaccta    360
tggcgctttg caaaagcgtg tcaaaaaaat ccagacaatc accctgatgc taaaaaacia    420
ggcgtttacg cgtggaaact aaagcttaat caaacggct ttgtttataa agtggatgag    480
ggccccgctc ccgatggcga agagtacttt gcgtttgac tacttaatgc ctctgctcgt    540
tgggggaatt cgggtgagtt taactactac aacgatgcca ttaccatggt aaacacaatt    600
aaaataaagc tgatggaaaa ccaaataatc cgcttttcac cttacattga taacctaaca    660
gacccttctt accatatacc tgcgttttac gactactttg caaataacgt aactaaccaa    720
gcagacaaaa attactggcg acaagtagcc acaaaaagta gaaccttact taaaaccat    780
tttacaagaag taagtggtag cccgcattgg aacttaccta catttttatc gcgcttagat    840
ggcagccctg ttattggcta catttttaac ggccaagcaa acccaggta atggtatgaa    900
tttgatgcat ggcgcgtaat tatgaatgtg ggttttagac cgatttaat ggggtgctcaa    960
gcgtggcata aaagtgcagt taataaagca ctgggctttt taagttatgc aaaaacaaac   1020
aacagtaaaa actgttacga gcaagtgtat tcgtacggtg gagcgcaaaa cagaggctgt   1080
gcaggcgaag gtcaaaaagc cgcgaatgca gtagcgttac ttgcttcaac aaatgctggg   1140
caagcaaatg agttttttaa cgaattttgg tctttatcgc aaccaacggg tgactaccgt   1200
tactataatg gttcgttata tatgttagct atgctgcatg taccgggcaa ttttaagttt   1260
tataacaaca cgtttaatta a                                     1281
    
```

5

<210> 7
 <211> 426
 <212> PRT
 <213> *Pseudoalteromonas haloplanktis*

10

<220>
 <221> otras características
 <223> xilanasa de *Pseudoalteromonas haloplanktis* (código de acceso EMBL AJ427921)

15

<400> 7

```

Met Lys Val Phe Phe Lys Ile Thr Thr Leu Leu Leu Ile Leu Ile Ser
1           5           10           15
Tyr Gln Ser Leu Ala Ala Phe Asn Asn Asn Pro Ser Ser Val Gly Ala
                20           25           30
Tyr Ser Ser Gly Thr Tyr Arg Asn Leu Ala Gln Glu Met Gly Lys Thr
                35           40           45
Asn Ile Gln Gln Lys Val Asn Ser Thr Phe Asp Asn Met Phe Gly Tyr
                50           55           60
Asn Asn Thr Gln Gln Leu Tyr Tyr Pro Tyr Thr Glu Asn Gly Val Tyr
65           70           75           80
    
```

ES 2 360 942 T3

Lys Ala His Tyr Ile Lys Ala Ile Asn Pro Asp Glu Gly Asp Asp Ile
85 90 95

Arg Thr Glu Gly Gln Ser Trp Gly Met Thr Ala Ala Val Met Leu Asn
100 105 110

Lys Gln Glu Glu Phe Asp Asn Leu Trp Arg Phe Ala Lys Ala Tyr Gln
115 120 125

Lys Asn Pro Asp Asn His Pro Asp Ala Lys Lys Gln Gly Val Tyr Ala
130 135 140

Trp Lys Leu Lys Leu Asn Gln Asn Gly Phe Val Tyr Lys Val Asp Glu
145 150 155 160

Gly Pro Ala Pro Asp Gly Glu Glu Tyr Phe Ala Phe Ala Leu Leu Asn
165 170 175

Ala Ser Ala Arg Trp Gly Asn Ser Gly Glu Phe Asn Tyr Tyr Asn Asp
180 185 190

Ala Ile Thr Met Leu Asn Thr Ile Lys Asn Lys Leu Met Glu Asn Gln
195 200 205

Ile Ile Arg Phe Ser Pro Tyr Ile Asp Asn Leu Thr Asp Pro Ser Tyr
210 215 220

His Ile Pro Ala Phe Tyr Asp Tyr Phe Ala Asn Asn Val Thr Asn Gln
225 230 235 240

Ala Asp Lys Asn Tyr Trp Arg Gln Val Ala Thr Lys Ser Arg Thr Leu
245 250 255

Leu Lys Asn His Phe Thr Lys Val Ser Gly Ser Pro His Trp Asn Leu
260 265 270

Pro Thr Phe Leu Ser Arg Leu Asp Gly Ser Pro Val Ile Gly Tyr Ile
275 280 285

Phe Asn Gly Gln Ala Asn Pro Gly Gln Trp Tyr Glu Phe Asp Ala Trp
290 295 300

Arg Val Ile Met Asn Val Gly Leu Asp Ala His Leu Met Gly Ala Gln
305 310 315 320

Ala Trp His Lys Ser Ala Val Asn Lys Ala Leu Gly Phe Leu Ser Tyr
325 330 335

Ala Lys Thr Asn Asn Ser Lys Asn Cys Tyr Glu Gln Val Tyr Ser Tyr
340 345 350

Gly Gly Ala Gln Asn Arg Gly Cys Ala Gly Glu Gly Gln Lys Ala Ala
355 360 365

Asn Ala Val Ala Leu Leu Ala Ser Thr Asn Ala Gly Gln Ala Asn Glu
370 375 380

Phe Phe Asn Glu Phe Trp Ser Leu Ser Gln Pro Thr Gly Asp Tyr Arg
385 390 395 400

Tyr Tyr Asn Gly Ser Leu Tyr Met Leu Ala Met Leu His Val Ser Gly
405 410 415

Asn Phe Lys Phe Tyr Asn Asn Thr Phe Asn
420 425

<210> 8

<211> 388

<212> PRT

<213> *Bacillus halodurans*

5

<220>

<221> otras características

<223> xilanasa Y procedente de cepa de *Bacillus halodurans* C-125
(GenBank / GenPept™ código de acceso BAB05824)

10

<400> 8

```

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

```

ES 2 360 942 T3

Ala Ser Arg Glu Tyr Leu Lys Ile Ala Cys His Pro Glu Thr Gly Leu
 225 230 235 240

Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Tyr Asp Gly Thr Pro Asn Asp Glu Lys Gly
 245 250 255

Tyr Gly His Phe Phe Ser Asp Ser Tyr Arg Val Ala Ala Asn Ile Gly
 260 265 270

Leu Asp Ala Glu Trp Phe Gly Gly Ser Glu Trp Ser Ala Glu Glu Ile
 275 280 285

Asn Lys Ile Gln Ala Phe Phe Ala Asp Lys Glu Pro Glu Asp Tyr Arg
 290 295 300

Arg Tyr Lys Ile Asp Gly Glu Pro Phe Glu Glu Lys Ser Leu His Pro
 305 310 315 320

Val Gly Leu Ile Ala Thr Asn Ala Met Gly Ser Leu Ala Ser Val Asp
 325 330 335

Gly Pro Tyr Ala Lys Ala Asn Val Asp Leu Phe Trp Asn Thr Pro Val
 340 345 350

Arg Thr Gly Asn Arg Arg Tyr Tyr Asp Asn Cys Leu Tyr Leu Phe Ala
 355 360 365

Met Leu Ala Leu Ser Gly Asn Phe Lys Ile Trp Phe Pro Glu Gly Gln
 370 375 380

Glu Glu Glu His
 385

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la preparación de un producto panificado, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de adición a la masa de dicho producto panificado de una composición mejorada mejoradora del pan que comprende por lo menos una enzima con actividad xilanólítica seleccionada de entre el grupo constituido por la familia 8 de las glucósido oxidasas.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la enzima hidroliza con inversión de configuración.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la enzima es una xilanasa obtenida a partir de la cepa *Pseudoalteromonas haloplanktis*.
- 15 4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la cepa es la TAH3a de *Pseudoalteromonas haloplanktis* y la xilanasa obtenida presenta preferentemente la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 7.
5. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la enzima es una xilanasa obtenida a partir de la cepa *Bacillus halodurans*.
- 20 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la cepa es la C-125 de *Bacillus halodurans* y la xilanasa obtenida presenta preferentemente la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 8.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición mejoradora del pan se añade durante el mezclado de la masa.
- 25 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición mejoradora del pan comprende además otro agente mejorador del pan que seleccionado de entre la lista constituida por otras enzimas, emulsionantes, oxidantes, leche en polvo, grasas, azúcares, aminoácidos, sales, proteínas (gluten, puntos de unión a la celulosa) o una mezcla de los mismos.
- 30 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la otra enzima se selecciona de entre la lista constituida por alfa-amilasas, beta-amilasas, amilasas maltógenas, otras xilanasas, proteasas, glucosa oxidasas, óxido-reductasas, glucanasas, celusadas, transglutaminasas, isomerasas, lipasas, fosfolipasas, pectinasas o una mezcla de las mismas.
- 35 10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la alfa-amilasa se obtiene preferentemente a partir de *Aspergillus oryzae*.
- 40 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enzima con actividad xilanólítica está presente como extracto celular, extracto exento de células o como proteína purificada.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enzima con actividad xilanólítica se mezcla con otros ingredientes en forma de un polvo seco, de un granulado, o en forma de un líquido.
- 45 13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que la enzima es mezclada con estabilizadores.
14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que los estabilizadores son seleccionados de entre el grupo constituido por polioles, azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes de azúcar.
- 50 15. Procedimiento para aumentar el volumen de la barra de un producto panificado, que comprende la etapa de adición durante el mezclado de la masa de dicho producto panificado de una cantidad suficiente de una enzima con actividad xilanólítica seleccionada de entre el grupo constituido por las xilanasas de la familia 8 de la glucósido hidrolasas.
- 55 16. Procedimiento para aumentar el volumen de la barra de un producto panificado o para aumentar la profundidad del corte en la superficie de un producto panificado, que comprende la etapa de adición durante el mezclado de la masa de dicho producto panificado de una cantidad suficiente de una enzima con actividad xilanólítica seleccionada de entre el grupo constituido por las xilanasas de la familia 8 de la glucósido hidrolasa, de una glucósido hidrolasa de la familia 8 que hidroliza con inversión de configuración y/o una combinación de las mismas.
- 60 17. Composición mejoradora del pan para aumentar el volumen de la barra de un producto panificado o para aumentar la profundidad de corte en la superficie de un producto panificado, caracterizada porque comprende un agente de mejora del pan y por lo menos una enzima con actividad xilanólítica seleccionada de entre el grupo constituido por la familia 8 de las glucósido hidrolasas.
- 65 18. Composición mejoradora del pan según la reivindicación 17, en la que la enzima hidroliza con inversión de configuración.

19. Composición mejoradora del pan según la reivindicación 17 ó 18, en la que la enzima es una xilanasas obtenida a partir de la cepa *Pseudoalteromonas haloplanktis*.
- 5 20. Composición mejoradora del pan según la reivindicación 19, en la que la cepa es TAH3a de *Pseudoalteromonas haloplanktis* y la xilanasas obtenida presenta preferentemente la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 7.
21. Composición mejoradora del pan según la reivindicación 17 ó 18, en la que la enzima es una xilanasas obtenida a partir de la cepa *Bacillus halodurans*.
- 10 22. Composición mejoradora del pan según la reivindicación 21, en la que la cepa es C-125 de *Bacillus halodurans* y la xilanasas obtenida presenta preferentemente la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 8.

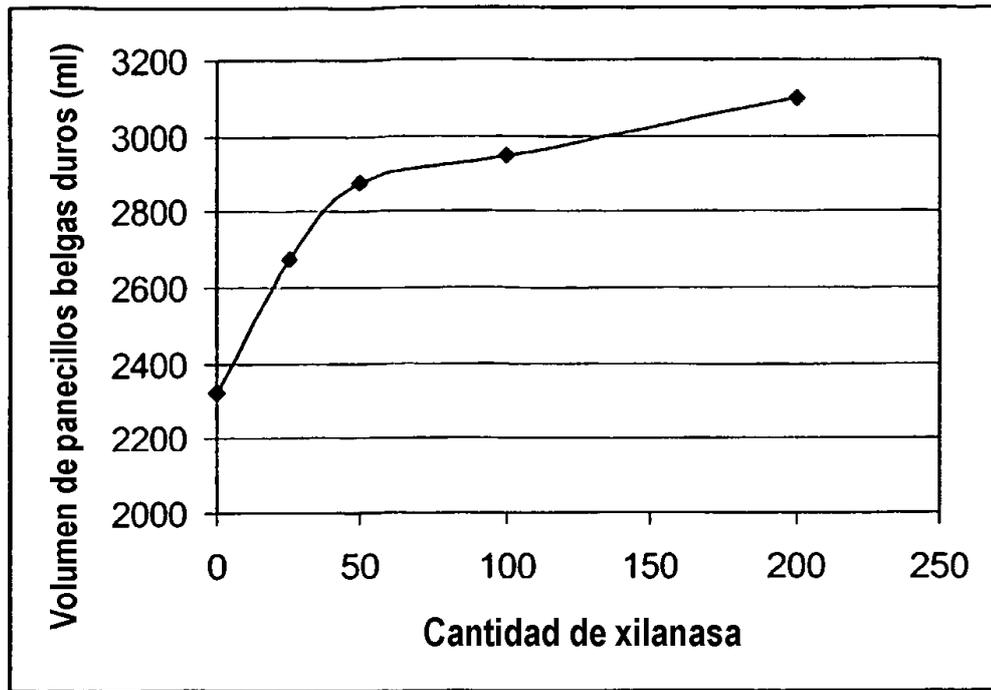


Fig. 1

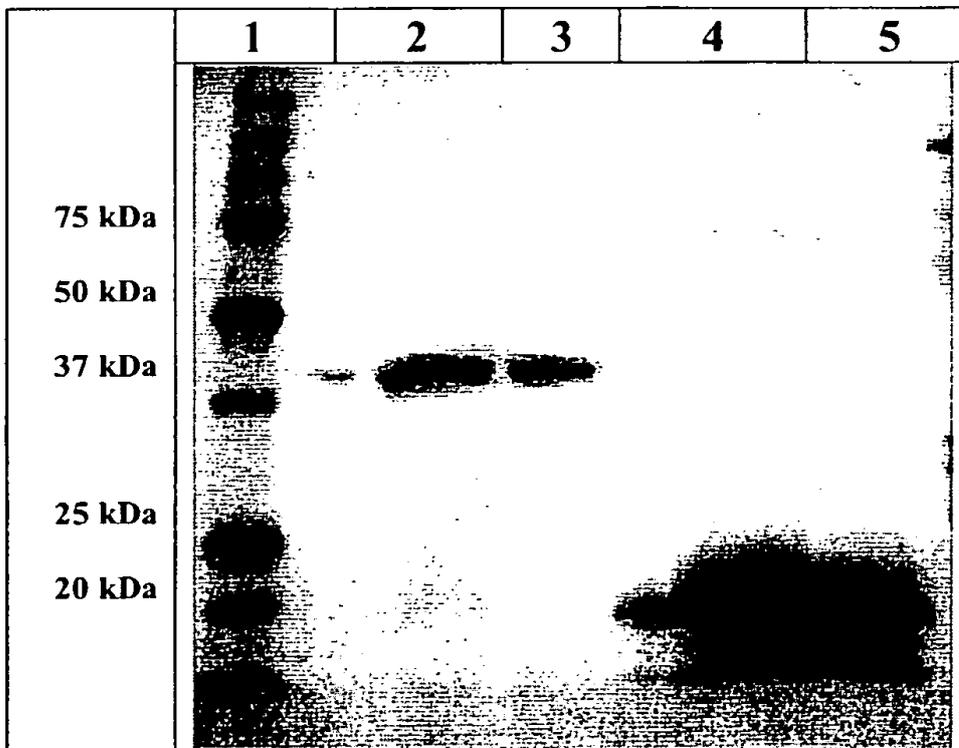


Fig. 2

```

atgaaagtat tttttaaaat aacaacttta ttgttaatac taataagcta
tcaatcactt gctgcattta ataataacce atcgagtgta ggcgctaca
gttcagggac ataccgtaac ctgcgacaag aaatgggtaa aacaaatata
cagcaaaagg tgaatagtac ttttgacaat atgtttggct ataacaacac
acaacaactt tactaccgct acaccgaaaa cgggtgttat aaagcacact
acataaaagc aattaacceca gacgaaggcg acgatataag aacagaaggg
caatcgtggg gaatgaccgc cgctgtcatg ctttaataaac aagaagaatt
tgataaccta tggcgctttg caaaagcgtg tcaaaaaaat ccagacaatc
accctgatgc taaaaaaciaa ggcgtttacg cgtggaaact aaagcttaat
caaaacggct ttgtttataa agtggatgag ggccccgctc ccgatggcga
agagtacttt gcgtttgac tacttaatgc ctctgctcgt tgggggaatt
cgggtgagtt taactactac aacgatgcca ttaccatggt aaacacaatt
aaaaataagc tgatggaaaa ccaaataatc cgcttttcac cttacattga
taacctaaac gacccttctt accatatacc tgcgttttac gactactttg
caaataacgt aactaaccaa gcagacaaaa attactggcg acaagtagcc
acaaaaagta gaaccttact taaaaccat ttacaaaag taagtggtag
cccgcattgg aacttaccta catttttatc gcgcttagat ggcagccctg
ttattggcta catttttaac ggccaagcaa acccaggcca atgggatgaa
tttgatgcat ggcgcgtaat tatgaatgtg ggtttagacg cgcatttaat
gggtgctcaa gcgtggcata aaagtgcagt taataaagca ctgggctttt
taagtatgc aaaaacaac aacagtaaaa actgttacga gcaagtgtat
tcgtacggtg gagcgcaaaa cagaggctgt gcaggcgaag gtcaaaaagc
cgogaatgca gtagecgttac ttgcttcaac aaatgctggg caagcaaatg
agttttttta cgaattttgg tctttatcgc aaccaacggg tgactaccgt
tactataatg gttcgttata tatgttagct atgctgcatg tatcgggcaa
ttttaagttt tataacaaca cgtttaatta a (SEQ ID NO: 6)

```

Número de acceso AJ427921 de EMBL

Fig. 3A

```

MKVFFKITLLLLILISYQSLAAFNNNPSSVGAYSSGTYRNLAQEMGKTNIQQKVNSTFD
NMFQYNNNTQQLYYPYTENGVYKAHYIKAINPDEGDDIRTEGQSWGMTAAVMLNKQEEFD
NLWRFKAYQKNPDNHPDAKKQGVYAWKLKLNQNGFVYKVDEGPAPDGEEYFAFALLNA
SARWGNSEGFNYNDIAITMLNTIKNKLMEHQIIRFSPYIDNLTDPSYHIPAFYDYFANN
VTNQADKNYWRQVATKSRLLKNHFTKVSQSPHWNLPTFLSRLDGSPIVIGYIFNGQANP
GQWYEFDAWRVIMNVGLDAHLMGAQAWHKS AVNKALGFLSYAKTNNKNCYEQVYSYGG
AQNRGCAGEGQKAANAVALLASTNAGQANEFNEFWLSLSQPTGDYRYNGLYMLMLH
VSGNFKFYNNTFN (SEQ ID NO: 7)

```

Número de acceso AJ427921 de EMBL

Fig. 3B

MKKTTEGAFYTREYRNLFKEFGYSEAEIQERVKDTWEQLFGDNPETKIYYEVDLGLYL
LDTGNLDVRTEGMSYGMMMAVQMDRKDIFDRIWNWTMKNMYMTEGVHAGYFAWSCQPDG
TKNSWGPAPDGEEYFALALFFASHRWGDGDEQPFNYSEQARKLLHTCVHNGEGGPGHPM
WNRDNKLIKFIPEVEFSDPSYHLPHFYELFSLWANEEDRVFWKEAAEASREYLKIACHP
ETGLAPEYAYYDGPNDKGYGHFFSDSYRVAANIGLDAEWFGGSEWSAEEINKIQAFF
ADKEPEDYRRYKIDGEPFEEKSLHPVGLIATNAMGSLASVDGPYAKANVDLFWNTPVRT
GNRRYYDNCLYLFAMLALSNGFKIWFPEGQEEH (SEQ ID NO: 8)

Código de acceso de GenBank/GenPept™ BAB05824

Fig. 4