

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 921**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/24** (2006.01)

**C12N 9/26** (2006.01)

**C12N 9/30** (2006.01)

**C12P 7/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2012 PCT/EP2012/068041**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013 WO13037933**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2012 E 12759133 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2756078**

54 Título: **Composiciones que comprenden enzimas con actividad de endo-1,4-beta-xilanasas y enzimas con actividad de endo-1,3(4)-beta-glucanasas**

30 Prioridad:

**14.09.2011 EP 11181241**

**14.09.2011 US 201161534574 P**

**27.07.2012 US 201261676535 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.12.2017**

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS  
(100.0%)**

**Langebrogade 1  
1411 Copenhagen K, DK**

72 Inventor/es:

**SØRENSEN, JENS FRISBÆK y  
MILLER, LONE BRØND**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 645 921 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

Composiciones que comprenden enzimas con actividad de endo-1,4-beta-xilanasas y enzimas con actividad de endo-1,3(4)-beta-glucanasa

### Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a enzimas con propiedades mejoradas y a composiciones que comprenden estas enzimas adecuadas para su uso en la producción de un alimento, bebida (por ejemplo, cerveza), pienso o biocombustible, tal como en un proceso de producción de cerveza.

### Antecedentes de la invención

- 10 El uso de enzimas en la producción de cerveza es bien conocido. La aplicación de enzimas en la etapa de maceración para mejorar la filtrabilidad de la pulpa y aumentar el rendimiento del extracto se describe en el documento WO 97/42302.

Los documentos WO2005118769 y WO2005059084 se refieren a una etapa de maceración y filtración en un procedimiento para la producción de cerveza, y a composiciones enzimáticas para su uso en tal proceso.

- 15 El documento WO1999057325 se refiere a cepas de *Penicillium funiculosum*, a nuevas mezclas de enzimas obtenidas a partir de ella y a sus secuencias nucleicas.

El documento WO 2010/128140 se refiere a una composición enzimática que comprende un producto de expresión de *Trichoderma* en combinación con una o más enzimas de una especie fúngica diferente.

El documento WO 97/13853 se refiere a un método para identificar secuencias de ADN de proteínas de interés.

El documento WO 2009/108941 se refiere a enzimas útiles para degradar el material de la biomasa vegetal.

- 20 Banergee et al. (2010) *Biochnol Biofuels* 3, 22 se refiere a un estudio sobre cócteles de enzimas para combinaciones específicas de pretratamiento/biomasa.

Kvesitadze et al. (1994) *Microbios* 80, 115-23 se refiere a endo- $\beta$ -1,4-glucanasa y endo- $\beta$ -1,4-xilanasas del hongo termofílico *Allescheria terrestris*.

- 25 Ito et al. (1992) *Biosci Biotechnol Biochem* 56, 906-12 se refiere a la clonación del gen *xynA* que codifica la xilanasas A de *Aspergillus kawachii*.

Wang et al. (2011) *Biotechnol Lett* 33, 1029-38 se refiere a la clonación de una endo-1,4- $\beta$ -D-xilanasas de *Aspergillus usamii*.

- 30 Sin embargo, existe la necesidad de enzimas mejoradas, así como la combinación de enzimas útiles en las producciones de productos alimenticios y bebidas, tales como en las etapas de maceración, cocción y filtración en la producción de una bebida alcohólica, tal como cerveza o whisky.

### Objeto de la invención

- 35 Un objeto de las realizaciones de la invención es proporcionar enzimas adecuadas para la producción de productos alimenticios y bebidas, tales como en la producción de una bebida alcohólica o no alcohólica, tal como una bebida a base de cereal o malta, tal como la cerveza o el whisky. Las enzimas proporcionadas pueden tener propiedades mejoradas en relación con su uso en el proceso de producción de cerveza. Estas amplias variedades de propiedades mejoradas comprenden, p. ej., la mejora de los óptimos de temperatura, la mejora de la relación de la actividad sobre sustratos de arabinoxilano solubles (WE-AX) en insolubles (WU-AX), la reducción de la presión total acumulada durante las etapas de clarificación y/o filtración de un proceso de producción de cerveza, así como el incremento de la filtrabilidad del material tratado enzimáticamente.

### Sumario de la invención

Se ha encontrado por los presentes inventores que una o más enzimas así como ciertas combinaciones de enzimas tienen propiedades mejoradas con respecto a las enzimas y combinaciones enzimáticas conocidas, particularmente en relación con su uso en un proceso de elaboración de cerveza, en el que el material que contiene almidón se trata con una o más enzimas para producir una masa de fermentación.

- 45 En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende una enzima que exhibe actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas, enzima que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 1; en combinación con una enzima que presenta actividad de endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanasa, enzima que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 7.

- 5 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una composición de acuerdo con la invención en la producción de un producto alimenticio, alimento o bebida de malta, en la producción de masa o productos horneados, en la preparación de pasta o de papel, para la preparación de componentes de cereales, tales como en los que el cereal es el centeno, el trigo o la cebada, en la producción de cerveza o modificación de subproductos de un proceso de producción de cerveza, en la producción de vino o zumo o en la producción de un biocombustible de primera o segunda generación, tal como el bioetanol.
- 10 En el presente documento se describe una enzima que exhibe actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas, enzima que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con cualquiera seleccionada entre SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, o cualquier fragmento funcional del mismo.
- Como se usa en el presente documento, el "fragmento funcional" se refiere a una versión truncada de una enzima con esencialmente el mismo o al menos un grado significativo de actividad enzimática como la enzima de referencia no truncada.
- 15 Se describe en el presente documento una enzima que presenta actividad de endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanasa, enzima que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con cualquiera seleccionada de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o cualquier fragmento funcional del mismo.
- Se describe en el presente documento una construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica una enzima como la descrita en el presente documento.
- 20 Se describe en el presente documento un vector de expresión recombinante que comprende una construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica una enzima como la descrita en el presente documento.
- Se describe en el presente documento una célula que ha sido transformada con una construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica una enzima como la descrita en el presente documento.
- 25 Se describe en el presente documento una preparación que comprende una enzima, o una construcción de ADN, o un vector, o una célula como los descritos en el presente documento.
- Se describe en el presente documento una composición que comprende una enzima que exhibe actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas como la descrita en el presente documento en combinación con una o más  $\beta$ -glucanasa.
- Se describe en el presente documento una composición que comprende una enzima que exhibe actividad de endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanasa como la descrita en el presente documento en combinación con una o más xilanasas.
- 30 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una composición de acuerdo con la invención en la producción de un producto alimenticio, de alimentación o de malta, tal como cerveza o whisky.
- En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una composición de acuerdo con la invención en la producción de masa o productos horneados.
- 35 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una composición de acuerdo con la invención en la preparación de pulpa o papel.
- En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una composición de acuerdo con la invención para la preparación de componentes de cereales. En algunas realizaciones, el cereal es centeno, trigo o cebada.
- En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una composición de acuerdo con la invención en la producción de cerveza o modificación de subproductos de un proceso de producción de cerveza.
- 40 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una composición de acuerdo con la invención en la producción de vino o zumo.
- En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una composición de acuerdo con la invención en la producción de un biocombustible de primera o segunda generación, tal como bioetanol.
- 45 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para alterar la filtrabilidad de un material que comprende almidón, comprendiendo dicho método la etapa de tratar dicho material que comprende almidón con una composición de acuerdo con la invención.
- En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para reducir la presión acumulada durante el tratamiento en una aplicación de producción de cerveza, comprendiendo dicho método la etapa de tratar una masa fermentada con una composición de acuerdo con la invención.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para la producción de un producto alimenticio, de pienso o de bebida, tal como una bebida alcohólica o no alcohólica, tal como una bebida a base de cereal o malta como cerveza o whisky, comprendiendo dicho método la etapa de tratar un material que comprende almidón con una composición de acuerdo con la invención.

- 5 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para la producción de una masa de fermentación, comprendiendo dicho método la etapa de tratar un material que comprende almidón con una composición de acuerdo con la invención.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para la producción de un biocombustible de primera o segunda generación, tal como bioetanol, comprendiendo dicho método la etapa de tratar un material que comprende almidón con una composición según la invención.

- 10

Se describen en este documento productos obtenidos mediante un método según la invención.

Se describe en este documento una composición que comprende el producto obtenido por un método de acuerdo con la invención, tal como en el que el producto está en un intervalo de 0,1% a 99,9%.

### Leyendas a la figura

- 15 Fig. 1: Perfil de maceración utilizado en la producción de cerveza a escala de laboratorio y a escala piloto. El proceso de maceración se inició por un periodo de maceración de 10 min después de lo cual se añadió la enzima.

- Fig. 2: La producción de cerveza a escala piloto es el resultado de la verificación del cribado de gluconasa y xilanasas. La B. sub gluconasa S combinada con las A. tub xilanasas se ensayó contra un blanco y UltraFlo max. Los datos recogidos fueron el caudal medio (L/h), la presión total acumulada sobre la filtración (mm WC, donde 1 mm WC = 9,80665 Pa) y la presión máxima registrada durante la filtración (mm WC).

- 20

Fig. 3: Funcionalidad de xilanasas en la producción de cerveza

Fig. 4: Aplicación de producción de cerveza por flujo de varios candidatos de xilanasas

Fig. 5: Filtración de la cerveza - promedio de filtraciones repetidas

Fig. 6: Filtración de la cerveza - promedio de filtraciones repetidas

- 25 Fig. 7: Diagrama de maceración del ejemplo 3.

### Descripción detallada de la invención

A la cerveza se la denomina tradicionalmente bebida alcohólica derivada de malta, tal como de la malta derivada del grano de cebada, y opcionalmente acompañada, tal como de material vegetal que contiene almidón (por ejemplo, granos de cereal) y opcionalmente aromatizada, p. ej. con lúpulos.

- 30 En el contexto de la presente invención, se entiende que el término "cerveza" comprende cualquier mosto fermentado, producido por producción de cerveza/preparación de un material vegetal que contiene almidón, en particular también cerveza producida exclusivamente a partir de adyuvante, o cualquier combinación de malta y adyuvante.

- 35 La expresión "producción de cerveza" significa en el presente contexto la producción de una sustancia tal como etanol mediante el cultivo de microorganismos en un cultivo. Comúnmente, se utilizan para la producción de cerveza microorganismos tales como la levadura.

Como se usa en este documento, el término "malta" se entiende como cualquier grano de cereal maltado, tal como cebada malteada. "Adyuvante" puede definirse como cualquier material vegetal que contenga almidón que no sea malta o malta de cebada.

- 40 "Material vegetal que contiene almidón" puede, p. ej., ser uno o más cereales, tales como cebada, trigo, maíz, centeno, sorgo, mijo o arroz, y cualquier combinación de los mismos. El material vegetal que contiene almidón puede procesarse, p. ej., por molido, maltearse, parcialmente ser malteado o no. El cereal no malteado también se llama "grano crudo". Ejemplos de materiales vegetales no cereales que contienen almidón comprenden, p. ej., tubérculos tales como las patatas y la yuca.

- 45 Tal como se usa en la presente memoria, los términos "bebida" y "producto de bebidas" incluyen dichas bebidas fermentadas que forman espuma, tales como la cerveza entera malteada, cerveza elaborada bajo el nombre "Reinheitsgebot", ale, cerveza seca, cerveza sin alcohol, cerveza ligera, cerveza baja en alcohol, cerveza baja en calorías, cerveza Porter, cerveza Bock, cerveza de malta, licor de malta, cerveza sin alcohol, licor de malta sin alcohol y similares. El término "bebidas" o "producto de bebidas" también incluye cerveza no espumante y bebidas alternativas de malta tales como bebidas de malta con sabor a fruta, p. ej., aromatizadas con cítricos, tales como

- 50

bebidas de malta con sabor a limón, naranja, lima o bayas, bebidas de malta aromatizadas con licor, p. ej. licor de malta con sabor a vodka, ron o tequila, o bebidas de malta con sabor a café, tales como licor de malta con sabor a cafeína, y similares.

5 La cerveza puede prepararse a partir de una variedad de materiales vegetales que contienen almidón esencialmente por el mismo proceso, en el que el almidón consiste principalmente en homopolímeros de glucosa en los que los residuos de glucosa están unidos por alfa-1, 4- o alfa-1,6-enlaces, predominando el primero.

10 El proceso de fabricación de bebidas fermentadas tales como la cerveza se conoce comúnmente como producción de cerveza. Las materias primas tradicionales utilizadas en la fabricación de estas bebidas son el agua, el lúpulo y la malta. Además, o en lugar de la malta, aditivos tales como grano de maíz común, grano de maíz refinado, levadura molida de cerveza, arroz, sorgo, almidón de maíz refinado, cebada, almidón de cebada, cebada deshuesada, trigo, almidón de trigo, cereal torreficado, copos de cereal, centeno, avena, patata, tapioca y jarabes, tales como jarabe de maíz, jarabe de caña de azúcar, jarabe de azúcar invertido, jarabes de cebada y/o de trigo, y similares, como fuente de almidón. El almidón eventualmente se convertirá enzimáticamente en azúcares fermentables.

15 Por lo que respecta a las cervezas elaboradas predominantemente a partir de malta (por ejemplo, hasta un 15-20% de aditivo), por diversas razones, la malta, que es producida principalmente a partir de variedades seleccionadas de cebada, tiene el mayor efecto sobre el carácter y la calidad generales de la cerveza. En primer lugar, la malta es el principal agente aromatizante de la cerveza. En segundo lugar, la malta proporciona la mayor parte del azúcar fermentable. En tercer lugar, la malta proporciona las proteínas, lo que contribuirá al cuerpo y al carácter espumante de la cerveza. En cuarto lugar, la malta proporciona la actividad enzimática necesaria durante la maceración.

20 El lúpulo también contribuye significativamente a la calidad de la cerveza, incluyendo el sabor. En particular, el lúpulo (o los constituyentes del lúpulo) añade sustancias amargantes a la cerveza. Además, los lúpulos actúan como precipitantes de proteínas, establecen los agentes conservantes y ayudan en la formación de espuma y en la estabilización. No todas las cervezas se producen con lúpulo. También se pueden usar otros agentes estabilizantes, tales como proteasas (por ejemplo, papaína).

25 Sin pretender ser interpretado como limitante para la presente invención, se puede describir un proceso de preparación de cerveza convencional de la manera siguiente:

30 El procedimiento para preparar cerveza es bien conocido en la técnica, pero brevemente, implica cinco etapas: (a) trituración y/o cocción complementaria (b) separación y extracción del mosto (c) ebullición y salteado del mosto (d) enfriamiento, fermentación y almacenamiento, y (e) maduración, procesamiento y envasado. Típicamente, en la primera etapa, la malta molida o triturada se mezcla con agua y se mantiene durante un periodo de tiempo bajo temperaturas controladas para permitir que las enzimas presentes en la malta conviertan el almidón presente en la malta en azúcares fermentables.

35 En el segundo paso, el mosto es transferido a un "filtro de filtración" o filtro de pasta donde el líquido se separa del residuo del grano. Este líquido dulce se llama "mosto" y el residuo de sobra de grano se llama "grano gastado". La pasta se somete típicamente a una extracción, que implica añadir agua a la pasta para recuperar el extracto soluble residual del grano gastado.

En la tercera etapa, el mosto se hierva vigorosamente. Esto esteriliza el mosto y ayuda a desarrollar el color, sabor y olor. El lúpulo se agrega en algún momento durante la ebullición.

40 En la cuarta etapa, el mosto se enfría y se transfiere a un fermentador, que contiene la levadura o al que se añade la levadura. La levadura convierte los azúcares por fermentación en alcohol y gas dióxido de carbono; al final de la fermentación el fermentador se enfría o el fermentador puede enfriarse para detener la fermentación. La levadura flocula y se retira.

45 En el último paso, la cerveza se enfría y se almacena durante un periodo de tiempo, durante el cual la cerveza se aclara y su sabor se desarrolla, y cualquier material que pueda perjudicar la apariencia, el sabor y la vida útil de la cerveza se asienta. Antes del envasado, la cerveza es carbonatada y, opcionalmente, filtrada y pasteurizada.

Después de la fermentación, se obtiene una bebida que normalmente contiene de aproximadamente 2% a aproximadamente 10% de alcohol en peso. Los carbohidratos no fermentables no se convierten durante la fermentación y forman la mayoría de los sólidos disueltos en la cerveza final.

50 Este residuo permanece debido a la incapacidad de las amilasas de la malta a hidrolizar los enlaces alfa-1,6 del almidón. Los carbohidratos no fermentables contribuyen alrededor de 50 calorías por 12 onzas de cerveza.

Recientemente, ha existido una popularización generalizada de las bebidas elaboradas con cerveza llamadas cervezas ligeras, cervezas reducidas en calorías o cervezas bajas en calorías, particularmente en el mercado de los Estados Unidos. Como se define en los Estados Unidos, estas cervezas tienen aproximadamente un 30% menos de calorías que la cerveza "normal" de un fabricante.

- 5 Puede encontrarse más información sobre los procedimientos convencionales de elaboración de la cerveza, así como las definiciones de los términos utilizados en el campo de la tecnología de la elaboración de cerveza a aplicar en la presente invención, en "Technology Brewing and Malting" de Wolfgang Kunze del Research and Teaching Institute of Brewing, Berlín (VLB), 2ª edición revisada 1999, ISBN 3-921690-39-0, 3ª edición (2004): ISBN 3-921690-49-8, 4ª edición actualizada, 2010 (ISBN 978-3-921690-64-2).
- 10 Las xilanasas se clasifican en EC 3.2.1.8, EC 3.2.1.32, EC 3.2.1.136 y EC 3.2.1.156; su actividad puede medirse. p. ej., como se describe en los ejemplos. Las xilanasas adecuadas para ser usadas en combinación con una enzima que exhibe actividad de endo-1,3 (4)- $\beta$ -glucanosa de acuerdo con la invención incluyen cualquier xilanasas clasificada en EC 3.2.1.8, EC 3.2.1.32, EC 3.2.1.136 y EC 3.2.1.156, tal como cualquiera descrita en los documentos WO 2010072226, WO 2010072225, WO 2010072224, WO 2005059084, WO2007056321, WO2008023060A, WO9421785, WO2006114095, WO2006066582, US 2008233175, y WO10059424.
- La endo-1,4-beta xilanasas se clasifica como EC 3.2.1.8. La enzima provoca la endohidrólisis de los enlaces 1,4-beta-D-xilosínicos en los xilanos.
- 15 Las expresiones "xilanasas de la familia 11", "Glicósido hidrolasa (GH) de la familia 11" o simplemente "GH11 xilanasas", como se usa en la presente memoria, se refiere a una endo-1,4-beta xilanasas clasificada como EC 3.2.1.8, que provoca endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-xilosídicos en los xilanos y que se clasifica como una xilanasas de la familia 11 de acuerdo con B. Henrissat, "A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities." Biochem. J. 280 (1991), pp. 309-316.
- 20 Las expresiones "xilanasas de la Familia 10", "Glicósido hidrolasa (GH) de la familia 10", o simplemente "GH10 xilanasas" comprende enzimas con un número de actividades conocidas, tales como xilanasas (CE: 3.2.1.8); endo-1,3-beta-xilanasas (EC: 3.2.1.32); celobiohidrolasa (EC: 3.2.1.91). Estas enzimas fueron conocidas anteriormente como celulasa familia F.
- En algunas realizaciones, la enzima que exhibe la actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas es una xilanasas de la familia 11. En algunas realizaciones, la enzima que exhibe la actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas es una xilanasas de la familia 10.
- 25 En un aspecto, la composición enzimática de acuerdo con la invención tiene actividad de endo-1,4-beta-xilanasas medida por el ensayo descrito en los ejemplos.
- Un ensayo para medir la actividad de xilanasas puede llevarse a cabo a pH 3,5 o pH 5 y 50°C usando xilano como sustrato, o puede realizarse a diferentes valores de pH y temperatura para la caracterización y especificación adicionales de las enzimas. La actividad enzimática se calcula a partir del aumento de la absorbancia causada por la xilosa a 540 nm por unidad de tiempo.
- 30 En algunas realizaciones, la composición enzimática de acuerdo con la invención comprende una actividad de xilanasas de al menos aproximadamente 5000 U/g, tal como al menos aproximadamente 6000 U/g, tal como al menos aproximadamente 7000 U/g, tal como al menos aproximadamente 8000 U/g, tal como al menos aproximadamente 8500 U/g, según se mide en el ensayo descrito en los ejemplos.
- 35 La composición enzimática según la invención puede tener actividad celulolítica. El nombre sistemático de la celulosa es 4-(1,3;1,4)- $\beta$ -D-glucano 4-glucanohidrolasa y las enzimas celulolíticas o celulasas se clasifican en EC 3.2.1.4. La celulosa somete a endohidrólisis los enlaces de (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -glucosídicos en, p. ej., celulosa, liquenina y  $\beta$ -D-glucanos de cereal y también hidroliza enlaces 1,4 en  $\beta$ -D-glucanos que también contienen enlaces 1,3. La celulosa también tiene otros nombres tales como endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa,  $\beta$ -1,4-glucanasa,  $\beta$ -1,4-endoglucan hidrolasa, celulasa A, celulosina AP, endoglucanasa D, celulosa alcalina, celulasa A3, celudextrinasa, 9,5 celulasa, avicelasa, pancelasa SS y 1,4-(1,3;1,4)- $\beta$ -D-glucano 4-glucanohidrolasa.
- 40 En un aspecto de la invención, la actividad de celulasa de la composición enzimática de acuerdo con la invención se mide por el "método de actividad de celulasa" como se describe en lo que sigue bajo el título "Ensayos".
- 45 Se describen en este documento enzimas que tienen actividad de endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanasa que se determinan mediante el ensayo descrito en los ejemplos.
- " $\beta$ -glucanasa" o "beta-glucanasa", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una endo-1,3(4)-beta-glucanasa de EC 3.2.1.6. y cataliza la endohidrólisis de los enlaces (1 $\rightarrow$ 3) o (1 $\rightarrow$ 4) en los beta-D-glucanos cuando el residuo de glucosa, cuyo grupo reductor está implicado en el enlace a ser hidrolizado, se sustituye por sí mismo en C-3. Las beta-glucanasas adecuadas, que se usan en combinación con una enzima que exhibe actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas de acuerdo con la invención, incluyen cualquier beta-glucanasa descrita en los documentos WO2004087889, WO2005059084, WO9414953, WO2007056321, WO9531533, WO08023060, WO2005100582, WO9828410, WO9742301, WO2006066582, WO05118769, WO2005003319, y WO10059424.
- 50 El ensayo estándar se lleva a cabo a pH 5,0 y puede realizarse a diferentes valores de pH para la caracterización y especificación adicionales de las enzimas.

Una unidad de actividad de endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanasa se define como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu$ mol de equivalentes de glucosa por minuto en las condiciones del ensayo (pH 5,0 (o como se especifica) y 50°C).

5 En algunas realizaciones, la composición enzimática de acuerdo con la invención comprende una actividad de  $\beta$ -glucanasa de al menos aproximadamente 10000 U/g, tal como al menos aproximadamente 12000 U/g, tal como al menos aproximadamente 14000 U/g, tal como al menos aproximadamente 15.000 U/g, tal como al menos aproximadamente 18000 U/g, medida por el ensayo descrito en los ejemplos.

La composición enzimática según la invención puede tener una actividad de laminarinasa o puede comprender una o más enzimas adicionales que tienen actividad de laminarinasa. La actividad de la laminarinasa se determina como se describe en el ensayo de laminarasa descrito en la sección de Ensayo.

10 La laminarinasa puede ser una endo-1,3(4)-beta-glucanasa clasificada en E.C. 3.2.1.6 o glucano endo-1,3-beta-D-glucosidasa clasificada en E.C. 3.2.1.39. Endo-1,3(4)-beta-glucanasa con los nombres alternativos, laminarinasa, endo-1,3-beta-glucanasa, Endo-1,4-beta-glucanasa se clasifica en E.C. 3.2.1.6. Los sustratos incluyen laminarina, liquenina y D-glucanos de cereal y la enzima cataliza la endohidrólisis de los enlaces (1->3) o (1->4) en los beta-D-glucanos cuando el residuo de glucosa cuyo grupo reductor está implicado en el enlace a ser hidrolizado está sustituido por sí mismo en C-3. El glucano endo-1,3-beta-D-glucosidasa con los nombres alternativos (1->3)-beta-glucano endohidrolasa, endo-1,3-beta-glucanasa y laminarinasa se clasifica en EC 3.2.1.39 e hidroliza los enlaces (1->3)-beta-D-glucosídicos en (1->3)-beta-D-glucanos en sustratos como, por ejemplo, laminarina, paramilón y paquimán.

20 La composición enzimática según la invención puede tener actividad de arabinanasa o puede comprender una enzima adicional que tiene actividad de arabinanasa. La arabinanasa está clasificada como EC 3.2.1.99. El nombre sistemático es 5- $\alpha$ -L-arabinan 5- $\alpha$ -L-arabinanohidrolasa pero tiene varios otros nombres tales como arabinan endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinosidasa, y endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinanasa, endo- $\alpha$ -1,5-arabanasa, endo-arabanasa, 1,5- $\alpha$ -L-arabinan y 1,5- $\alpha$ -L-arabinanohidrolasa. La arabinasa produce la endohidrólisis de los enlaces (1 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -arabinofuranosídico en (1 $\rightarrow$ 5)-arabinanos. La arabinanasa también actúa sobre el arabinano.

25 La actividad de la arabinasa de la composición enzimática de acuerdo con la invención se puede medir mediante un ensayo de arabinasa como se describe en lo que sigue bajo el encabezamiento "Ensayos". El ensayo se puede llevar a cabo a pH 3,5 y 50°C utilizando como sustrato la remolacha azucarera arabinano, y puede realizarse a diferentes valores de pH y temperatura para su caracterización y especificación adicionales de enzimas. La actividad enzimática se calcula a partir del aumento de la absorbancia a 540 nm por unidad de tiempo.

30 Una unidad de actividad de la arabinasa se define como la cantidad de enzima (normalizada para el volumen de ensayo total) que da un aumento en  $\Delta OD_{540nm} \cdot \text{min}^{-1}$ , bajo las condiciones del ensayo (pH 3,5 y 50°C).

La composición enzimática de acuerdo con la invención puede tener actividad de beta-D-glucósido glucohidrolasa o puede comprender una enzima adicional que tiene beta-D-glucósido glucohidrolasa. La beta-D-glucósido glucohidrolasa se refiere a enzimas de E.C. 3.2.1.21.

35 La composición enzimática según la invención puede tener actividad de  $\beta$ -xilosidasa o puede comprender una enzima adicional que tiene actividad de  $\beta$ -xilosidasa. La " $\beta$ -xilosidasa" o "xilano 1,4-beta-xilosidasa" se refieren a enzimas de E.C 3.2.1.37. La  $\beta$ -xilosidasa cataliza la hidrólisis de (1->4)-beta-D-xilanos para eliminar los residuos de D-xilosa sucesivos de los extremos no reductores.

40 La composición enzimática según la invención puede tener actividad de celobiohidrolasa o puede comprender una enzima adicional que tiene actividad de celobiohidrolasa. La "celobiohidrolasa" o "celulosa 1,4-beta-celobiosidasa" se refieren a enzimas de EC 3.2.1.91. La celulosa 1,4-beta-celobiosidasa cataliza la hidrólisis de los enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en la celulosa y la celotetraosa, liberando celobiosa de los extremos no reductores de las cadenas.

45 La actividad de celobiohidrolasa de la composición enzimática de acuerdo con la invención se puede medir mediante el ensayo de celobiohidrolasa como se describe en lo que sigue bajo el título "Ensayos". El ensayo estándar se lleva a cabo a pH 5,0 y puede realizarse a diferentes valores de pH para la caracterización y especificación adicionales de las enzimas.

50 Una unidad de actividad de celobiohidrolasa se define como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol a partir de p-nitrofenil  $\beta$ -D-celobiopiransido por minuto en las condiciones del ensayo (pH 5,0 (o según se especifica) y 50°C).

La composición enzimática de acuerdo con la invención puede tener actividad de  $\alpha$ -N-arabinofuranosidasa o puede comprender una enzima adicional que tiene actividad de arabinofuranosidasa. " $\alpha$ -N-arabinofuranosidasa" o "alfa-N-arabinofuranosidasa" se refieren a enzimas de EC 3.2.1.55. La  $\alpha$ -N-arabinofuranosidasa cataliza la hidrólisis de los residuos terminales no reductores de alfa-L-arabinofuranosido en alfa-L-arabinósidos.

La actividad de arabinofuranosidasa de la composición enzimática de acuerdo con la invención se puede medir mediante el ensayo de arabinofuranosidasa como se describe en lo que sigue bajo el título "Ensayos". El ensayo estándar puede realizarse a pH 5,0 y 50°C y puede realizarse a diferentes valores de pH y temperatura para la caracterización y especificación adicionales de las enzimas.

- 5 Una unidad de actividad de  $\alpha$ -N-arabinofuranosidasa se define como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol a partir de p-nitrofenil  $\alpha$ -L-arabinofuranosida por minuto en las condiciones del ensayo (pH 5,0 y 50°C (o como se especifica)).

10 La composición enzimática según la invención puede tener actividad de glucano 1,4-beta-glucosidasa o puede comprender una enzima adicional que tiene actividad de glucano 1,4-beta-glucosidasa. "Glucano 1,4-beta-glucosidasa" o "glucano 1,4-beta-glucosidasa" se refieren a enzimas de E.C.3.2.1.74. La glucano 1,4-beta-glucosidasa cataliza la hidrólisis de los enlaces (1->4) en (1->4)-beta-D-glucanos, para eliminar unidades de glucosa sucesivas.

15 La composición enzimática de acuerdo con la invención tiene actividad de exo-beta-1,4-glucanasa específica de xiloglucano o puede comprender una enzima adicional que tiene actividad de exo-beta-1,4-glucanasa específica de xiloglucano. La "exo-beta-1,4-glucanasa específica de xiloglucano" se refiere a enzimas de E.C. 3.2.1.155. La exo-beta-1,4-glucanasa específica de xiloglucano cataliza la exohidrólisis de enlaces (1->4)-beta-D-glucosídicos en el xiloglucano.

20 Las enzimas y composiciones enzimáticas según se describen en este documento pueden utilizarse en un procedimiento que comprende reducir la viscosidad de una solución acuosa que comprende un hidrolizado de almidón.

Las enzimas y composiciones enzimáticas también pueden usarse en un proceso que comprende filtrar una solución acuosa que comprende un hidrolizado de almidón. En algunas realizaciones, la solución acuosa que comprende un hidrolizado de almidón es una pasta para la fabricación de cerveza, y en otras realizaciones, la solución acuosa que comprende un hidrolizado de almidón es una composición alimenticia.

25 Alternativamente, la composición enzimática de acuerdo con la presente invención puede ser utilizada en la producción de zumo de fruta, vino, procesamiento de grano, alcohol combustible, biocombustible de primera o segunda generación, tal como bioetanol y alcohol potable.

30 En algunas realizaciones, el biocombustible de primera o segunda generación, tal como el bioetanol, se produce a partir de reservas de piensos agrícolas tales como la caña de azúcar, patata, maíz, sorgo de trigo, etc., o de material celulósico tal como hojuelas de maíz, pasto aguja o cualquier otro material vegetal. En ambos casos, los azúcares fermentables se extraen de la materia prima y se fermentan por los microorganismos en alcohol, que se destila y se puede utilizar como combustible de transporte. La composición enzimática según la presente invención puede utilizarse en esta producción de biocombustible. El complejo de enzimas puede añadirse para mejorar la extracción de polisacáridos de la materia prima, ayudar a degradar los polisacáridos en azúcares fermentables y/o mejorar los parámetros de procesamiento, tales como la separación de líquidos de los sólidos, las características de flujo y la capacidad de bombeo.

El procedimiento de la invención puede aplicarse al macerado de cualquier granulado. De acuerdo con la invención, el grano puede comprender cualquier material vegetal que contenga almidón y/o azúcar que pueda derivarse de cualquier planta y partes de plantas, incluyendo tubérculos, raíces, tallos, hojas y semillas.

40 En algunas realizaciones, el grano comprende grano, tal como grano de cebada, trigo, centeno, avena, maíz, arroz, milo, mijo y sorgo, y más preferiblemente al menos 10%, o más preferiblemente al menos 15%, incluso más preferiblemente al menos el 25%, o lo más preferiblemente al menos el 35%, tal como al menos el 50%, al menos el 75%, al menos el 90% o incluso el 100% (p/p) del grano del mosto se deriva del grano.

45 En algunas realizaciones, el grano comprende grano maltado, tal como malta de cebada. Preferentemente, al menos 10%, o más preferiblemente al menos 15%, aún más preferiblemente al menos 25%, o lo más preferiblemente al menos 35%, tal como al menos 50%, al menos 75%, al menos 90% o incluso el 100% (p/p) del grano del mosto se deriva del grano maltado.

50 El término "pasta" se entiende como una suspensión acuosa de almidón, por ejemplo, que comprende la malta de cebada triturada, la cebada triturada y/u otro adyuvante o una combinación de los mismos, mezclados con agua posteriormente para separarse en mosto + gránulos gastados.

La expresión "separación de la pasta" se entiende como la separación del mosto de los granos gastados, tales como por aclarado o por filtración de la pasta.

55 La expresión "filtración de la cerveza" se entiende como un proceso de separación en el que las células de levadura y otros materiales causantes de la turbidez todavía presentes en la cerveza son eliminados, por ejemplo, por microfiltración o procesos de membrana.



La preparación enzimática, tal como en la forma de un ingrediente alimentario, puede estar en forma de una solución o como un sólido - dependiendo del uso y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración. La forma sólida puede ser como un polvo de enzima desecada o como una enzima granulada.

- 5 De acuerdo con esto, se describe una preparación de composición enzimática que comprende las enzimas descritas en esta invención o la composición enzimática según la invención, un vehículo enzimático y opcionalmente un estabilizante y/o un conservante.

El vehículo enzimático puede seleccionarse del grupo que consiste en glicerol o agua.

- 10 La preparación puede comprender un estabilizante. El estabilizante se puede seleccionar del grupo que consiste en sales inorgánicas, polioles, azúcares y combinaciones de los mismos. El estabilizante puede ser una sal inorgánica, tal como cloruro de potasio. El poliol puede ser glicerol, propilenglicol o sorbitol. El azúcar puede ser un carbohidrato de molécula pequeña, en particular cualquiera de varios de sabor dulce tales como la glucosa, la fructosa y la sacarosa.

La preparación puede comprender un conservante. El conservante es metilparabeno, propilparabeno, benzoato, sorbato u otros conservantes aprobados para alimentos o una mezcla de los mismos.

- 15 La enzima que presenta actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas, opcionalmente en combinación con una o más  $\beta$ -glucanasa de acuerdo con la presente invención proporciona una viscosidad significativamente reducida en aplicaciones de elaboración de cerveza que facilitan una separación mejorada de la pasta y la cerveza.

Las características de xilanasas deseadas para las aplicaciones de elaboración de cerveza pueden incluir uno o más de los siguientes aspectos:

- 20 a) Especificidad del sustrato enzimático

- La relación WE-AX/WU-AX tiene un impacto sobre la viscosidad. En algunas realizaciones esta relación es menor que aproximadamente 7,0, tal como menos de aproximadamente 6,5, tal como menos de aproximadamente 6,0, tal como menos de aproximadamente 5,5, tal como menos de aproximadamente 5,0, tal como menos de aproximadamente 4,5.

- 25 b) Selectividad del sustrato enzimático

- Se cree que tiene un impacto en la funcionalidad cómo de próximo la enzima o las enzimas cortan respecto a los puntos de ramificación.

- c) Termoestabilidad enzimática

- 30 - La solubilización continua de AX durante el macerado – la termoestabilidad es una característica clave. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la enzima que exhibe actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas de acuerdo con la presente invención es termoestable dentro de un intervalo de temperaturas de 65-78°C.

d) pH óptimo de la enzima. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la enzima que exhibe endo-1,4- $\beta$ -xilanasas tiene un pH óptimo en el intervalo de pH 5,4-5,6.

- e) Inhibición enzimática (por ejemplo, el factor clave conocido para las xilanasas)

- 35 Dicha viscosidad significativamente reducida en las aplicaciones de elaboración de la cerveza se puede medir como una viscosidad reducida en la aplicación de producción de cerveza en comparación con un control con una enzima conocida o combinación de actividades enzimáticas, tal como Ultraflo® Max usado en las mismas condiciones y cantidades.

- 40 La enzima que exhibe actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas de acuerdo con la presente descripción, opcionalmente en combinación con una o más  $\beta$ -glucananas de acuerdo con la presente descripción proporciona una separación mejorada de masa y cerveza en aplicaciones de elaboración de cerveza.

La enzima que exhibe actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas de acuerdo con la presente descripción, opcionalmente en combinación con una o más  $\beta$ -glucananas de acuerdo con la presente descripción, proporciona un potencial bajo para la formación de aromas, tal como la formación de aromas relacionada con la ruptura del arabinosilano.

- 45 La enzima que exhibe actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas de acuerdo con la presente descripción, opcionalmente en combinación con una o más  $\beta$ -glucananas de acuerdo con la presente descripción proporciona un menor riesgo de colapso del lecho de filtro, tal como en la filtración.

- 50 La enzima que exhibe actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas de acuerdo con la presente descripción, opcionalmente en combinación con una o más  $\beta$ -glucananas de acuerdo con la presente invención, proporciona una reducción en el potencial de aromas y/o la reducción del aroma en la formación del aroma. Se describe en este documento una

enzima que exhibe actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas, enzima que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con cualquiera seleccionada entre SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, o cualquier fragmento funcional del mismo.

- 5 También se describe en este documento una enzima que presenta actividad de endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanasa, enzima que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con cualquiera de las seleccionadas de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 o cualquier fragmento funcional del mismo.

- 10 En algunas realizaciones de la invención, la enzima que exhibe actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas tiene una relación en actividad sobre el sustrato de arabinoxilano soluble (WE-AX) frente al sustrato de arabinoxilano insoluble (WU-AX) de menos de aproximadamente 7,0, tal como como menos de aproximadamente 6,5, tal como menos de aproximadamente 6,0, tal como menos de aproximadamente 5,5, tal como menos de aproximadamente 5,0, tal como menos de aproximadamente 4,5.

- 15 En algunas realizaciones, la enzima de acuerdo con la invención tiene una temperatura óptima en el intervalo de 40-70°C, tal como en el intervalo de 45-65°C, tal como en el intervalo de 50-65°C, tal como en el intervalo de 55-65°C.

La enzima de acuerdo con la descripción puede tener al menos 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 1-18, o cualquier fragmento funcional del mismo.

- 20 En algunas realizaciones, la enzima de acuerdo con la invención tiene un número total de aminoácidos inferior a 350, tal como menos de 340, tal como menos de 330, tal como menos de 320, tal como menos de 310, tal como menos de 300 aminoácidos, tal como en el intervalo de 200 a 350, tal como en el intervalo de 220 a 345 aminoácidos.

- 25 La secuencia de aminoácidos de dicha enzima de acuerdo con la descripción puede tener al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos en comparación con cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1-18, o cualquier fragmento funcional de las mismas.

La secuencia de aminoácidos de dicha enzima de acuerdo con la descripción puede tener un máximo de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos comparado con cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1-18, o cualquier fragmento funcional de las mismas.

- 30 La enzima de acuerdo con la descripción puede comprender la secuencia de aminoácidos identificada por cualquiera de las SEQ ID NO: 1-18, o cualquier fragmento funcional de las mismas.

La enzima de acuerdo con la descripción puede consistir en la secuencia de aminoácidos identificada por cualquiera de las SEQ ID NO: 1-18, o cualquier fragmento funcional de las mismas.

- 35 También se describe en este documento una composición que comprende una enzima que exhibe actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas de acuerdo con la descripción en combinación con una o más  $\beta$ -glucanasas. Estas una o más  $\beta$ -glucanasas pueden ser de acuerdo con la descripción.

- 40 También se describe en este documento una composición que comprende una enzima que presenta actividad de endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanasa de acuerdo con la descripción en combinación con una o más xilanasas. En algunas realizaciones estas una o más xilanasas son enzimas que exhiben actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas de acuerdo con la descripción. Estas una o más xilanasas son enzimas según SEQ ID NO: 17 y/o SEQ ID NO: 18, o cualquier fragmento funcional de las mismas.

La combinación de una enzima que exhibe actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas con una enzima que exhibe actividad de endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanasa puede ser cualquier combinación según la siguiente tabla:

1ª enzima (Xilanasa) 2ª enzima (Glucanasa)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
SEQ ID NO:7	X	X	X	X	X	X	X	X
SEQ ID NO:8	X	X	X	X	X	X	X	X
SEQ ID NO:9	X	X	X	X	X	X	X	X
SEQ ID NO:10	X	X	X	X	X	X	X	X
SEQ ID NO:11	X	X	X	X	X	X	X	X
SEQ ID NO:12	X	X	X	X	X	X	X	X
SEQ ID NO:13	X	X	X	X	X	X	X	X
SEQ ID NO:14	X	X	X	X	X	X	X	X
SEQ ID NO:15	X	X	X	X	X	X	X	X
SEQ ID NO:16	X	X	X	X	X	X	X	X

5 Debe entenderse que cualquiera de la combinación anterior de una 1ª enzima que es una enzima que exhibe actividad de endo-1,4-β-xilanasa puede combinarse con una enzima que exhibe actividad de endo-1,3(4)-β-glucanasa con una relación entre las dos enzimas de 1:10, 2:10, 3:10, 4:10, 5:10, 6:10, 7:10, 8:10, 9:10, 10:10, 10:9, 10:8, 10:7, 10:6, 10:5, 10:4, 10:3, 10:2 o 10:1, tal como dentro de un intervalo de 1:10-10:1, tal como 2:10-10:2, tal como 3:10-10:3, tal como 4:10-10:4, tal como 5:10-10:5, tal como 6:10-10:6, tal como 7:10-10:7, tal como 8:10-10:8, o dentro de 9:10-10:9.

10 En algunas realizaciones la composición de acuerdo con la invención comprende una combinación de al menos dos enzimas, dichas dos enzimas o las dos enzimas con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID respectiva, siendo seleccionada de la lista que consiste en SEQ ID: NO 1 y SEQ ID NO: 7;

También se describen en el presente documento las siguientes composiciones:

- SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 7;
- SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 7;
- 15 SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 7;
- SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7;
- SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7;
- SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 7;
- SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 7;
- 20 SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 8
- SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 8
- SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 8
- SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 8
- SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 8
- 25 SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8
- SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 8;
- SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 8;
- SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 9;
- SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 9;
- 30 SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 9;

- SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 9;
- SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 9;
- SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 9;
- SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 9;
- 5 SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 9;
- SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 10;
- SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10;
- SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 10;
- SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 10;
- 10 SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 10;
- SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 10;
- SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 10;
- SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 10;
- SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 11;
- 15 SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 11;
- SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 11;
- SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 11;
- SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 11;
- SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 11;
- 20 SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 11;
- SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 11;
- SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 12;
- SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 12;
- SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 12;
- 25 SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 12;
- SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 12;
- SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 12;
- SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 12;
- SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 12;
- 30 SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 13;
- SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 13;
- SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 13;
- SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 13;
- SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 13;
- 35 SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 13;
- SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 13;
- SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 13;

- SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 14;  
 SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 14;  
 SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 14;  
 SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 14;
- 5 SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 14;  
 SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 14;  
 SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 14;  
 SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 14;  
 SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 15;
- 10 SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 15;  
 SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 15;  
 SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 15;  
 SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 15;  
 SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 15;
- 15 SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 15;  
 SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 15;  
 SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 16;  
 SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 16;  
 SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 16;
- 20 SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 16;  
 SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 16;  
 SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 16;  
 SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 16; y  
 SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 16.
- 25 En algunas realizaciones, la actividad de endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanasa y la actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasa se derivan de al menos dos enzimas diferentes, tales como al menos dos enzimas diferentes de dos especies diferentes.
- En algunas realizaciones la presión total acumulada se reduce a un valor de menos de 470 mm de WC, tal como menos de 450 mm de WC, tal como menos de 430 mm de WC, tal como menos de 410 mm de WC, tal como menos de 390 mm WC, tal como menos de 370 mm de WC, tal como menos de 350 mm de WC, tal como menos de 330 mm de WC, tal como menos de 310 mm de WC, tal como menos de 300 mm de WC, tal como menos de 290 mm de WC, cuando la composición de acuerdo con la presente invención se usa antes del aclarado en una aplicación de producción de cerveza.
- 30 En algunas realizaciones la presión total acumulada se reduce en al menos 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93 o 95% en comparación con el uso de un control negativo sin dicha composición; cuando se utiliza antes del aclarado en una aplicación cervecera.
- 35 En algunas realizaciones, la capacidad de filtración del mosto medida por el volumen de mosto recogido después de 5 min de filtración con respecto a un control sin enzimas se incrementa por encima de 1,5, tal como por encima de 1,6, tal como por encima de 1,7, tal como por encima de 1,8, tal como por encima de 1,9, tal como por encima de 2,0, tal como por encima de 2,1, tal como por encima de 2,2, tal como por encima de 2,3, tal como por encima de 2,4, tal como por encima de 2,5, cuando la composición de acuerdo con la invención se utiliza en una preparación cervecera antes de la separación del mosto.
- 40

- En algunas realizaciones, la capacidad de filtración del mosto, medida por el volumen de mosto recogido después de 5 min de filtración, aumenta al menos 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 o 300% en comparación con el uso de un control negativo sin dicha composición.
- En algunas realizaciones, la composición de acuerdo con la invención comprende una o más enzimas adicionales. En algunas realizaciones, la enzima o las enzimas adicionales se seleccionan de una lista que consiste en una xilanasa clasificada en EC 3.2.1.32, EC 3.2.1.136 o EC 3.2.1.156, una celulasa, una laminarinasa, una endo-1,5-a-L-arabinanasa, una beta-D-glucosida glucosidasa, una  $\beta$ -xilosidasa, una celobiohidrolasa, una glucano 1,4-beta-glucosidasa, una exo-beta-1,4-glucanasa específica de xiloglucano y una a-N-arabinofuranosidasa.
- Las secuencias y enzimas identificadas por una secuencia como se menciona en este documento y usadas de acuerdo con la presente invención solas o en combinación con otras enzimas o compuestos pueden estar con o sin péptido señal.
- Ensayos
- 15 Método de actividad de la DNS celulasa (método DNS CMC)
- Nombre sistemático: 1,4-(1,3;1,4)- $\beta$ -D-glucano 4-glucanohidrolasa
- IUB Número: EC 3.2.1.4
- Principio
- 20 El ensayo de la celulasa se basa en la endo-hidrólisis enzimática de los enlaces 1,4- $\beta$ -D-glucosídicos en carboximetilcelulosa (CMC), un  $\beta$ -1,4-glucano. Los productos de la reacción (oligosacáridos  $\beta$ -1,4 glucano) se determinaron colorimétricamente midiendo el aumento resultante en grupos reductores usando un reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico. La actividad enzimática se calculó a partir de la relación entre la concentración de grupos reductores, como equivalentes de glucosa, y la absorbancia a 540 nm.
- 25 El ensayo se llevó a cabo a pH 5,0, pero se puede realizar a diferentes valores de pH para la caracterización y especificación adicionales de las enzimas.
- Definición de la unidad
- Una unidad de actividad de celulasa se define como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu$ mol de equivalentes de glucosa por minuto en las condiciones del ensayo (pH 5,0 (o según se especifica) y 50°C).
- Materiales
- 30 Carboximetilcelulosa. Proveedor: Megazyme Ltd. N°. producto: CM-Celulosa 4M
- D-Glucosa 'AnalaR'. Proveedor: Merck Ltd (BDH). N°. producto: 10117. P.M.: 180,16
- Acetato de sodio anhidro 'AnalaR'. Proveedor: Merck Ltd (BDH). N°. producto: 10236. P.M.: 82,03
- Ácido acético ("glacial") "AnalaR". Proveedor: Merck Ltd (BDH). N°. producto: 10001. P.M.: 60,05
- 35 Ácido 3,5-dinitrosalicílico GPR (ácido 3,5-dinitro-2-hidroxibenzoico). Proveedor: Merck Ltd (BDH). N°. producto: 28235
- Pelletes de hidróxido sódico 'AnalaR'. Proveedor: Merck Ltd (BDH). N°. producto: 10252. P.M.: 40,00
- (+)-Tartrato de potasio y sodio 'AnalaR'. Proveedor: Merck Ltd (BDH). N°. producto: 10219. P.M.: 282,22
- Carboximetilcelulosa (CMC) 1,5% (Solución al p/v) en tampón de acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0 (solución de sustrato).
- 40 Solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). 20 g/l de DNS en un tampón que contenía gránulos de hidróxido sódico 32 g/l y 600 g/l de (+)-tartrato de potasio y sodio.
- Solución patrón de glucosa (0,50 mg/ml)
- Procedimiento
- 45 La composición enzimática se diluyó en muestras y una curva estándar de glucosa como se muestra en la fig. 2 con concentraciones de glucosa de 0, 0,125, 0,25, 0,375 y 0,5 mg/ml.

## ES 2 645 921 T3

0,25 ml de solución de enzima se mezclaron con 1,75 ml de la solución de sustrato (1,5% p/v) a 50°C y la reacción se detuvo después de 10 min por la adición de solución de DNS. Esto se siguió calentando a 95°C durante 5 minutos.

La densidad óptica se midió a 540 nm ( $OD_{540}$ ) de las diferentes muestras.

### 5 Cálculos

La actividad enzimática se determina a partir de la curva estándar como se muestra en la fig. 2.

La actividad se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Actividad (u.ml}^{-1} \text{ o u.g}^{-1}) = \frac{T - c}{m} \times A \times \frac{1}{180,16} \times 10^3 \times \frac{1}{V} \times \frac{1}{t} \times D$$

donde:

10  $T = \Delta OD_{540nm} \text{ PRUEBA}$

$= \Delta OD_{540nm} \text{ PRUEBA} - OD_{540nm} \text{ CONTROL}$

$m$  = gradiente de la curva patrón (aproximadamente 1,0)

$c$  = intersección del eje y de la curva estándar (siempre negativo y aproximadamente -0,02)

180,16 = peso molecular de glucosa

15  $10^3 \equiv$  para convertir a  $\mu$ moles

$A \equiv$  volumen de ensayo en ml

$V \equiv$  volumen enzimático en ml

$t \equiv$  tiempo de ensayo en minutos

$D$  = factor de dilución enzimática real (por ejemplo, para 1,000 g diluido a 1 litro  $D = 1000$ )

### 20 Laminarinasa (método de la laminarina de DNS)

Principios

La reacción, catalizada por la laminarinasa, implica la endohidrólisis de los enlaces 1,3-glucosídicos en 1,3- $\beta$ -D-glucanos. Los sustratos incluyen laminarina, Paramylon y Pachyman. Los productos de la reacción (oligosacáridos de  $\beta$ -1,3-glucano) se determinan colorimetricamente midiendo el aumento resultante en grupos reductores usando un reactivo de ácido 3,5-dinitrosalicílico. La actividad enzimática se calcula a partir de la relación entre la concentración de grupos reductores, como equivalentes de glucosa, y la absorbancia a 540 nm.

25 El ensayo se llevó a cabo a pH 5,0 y 50°C, pero se puede realizar a diferentes valores de pH y temperatura para la caracterización y especificación adicionales de enzimas.

Definición de la unidad

30 Una unidad de actividad de laminarinasa se define como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu$ mol de equivalentes de glucosa por minuto en las condiciones del ensayo (pH 5,0 y 50°C (o como se especifica)).

Materiales

Véanse los materiales dados anteriormente para el ensayo de actividad de celulasa.

Laminarina (de *Laminaria digitata*). Proveedor: Sigma-Aldrich Co. Ltd. N°. producto: L 9634

35 Solución de laminarinina al 1,00% (solución p/v) (solución de sustrato, tampón de acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0)

1,75 ml de solución de laminarina se mezclan con 0,25 ml de solución de enzima diluida a 50°C durante 10 minutos y la reacción se detiene mediante la adición de 2 ml de solución de DNS.

La curva estándar se realizó usando solución de glucosa 0, 0,125, 0,25, 0,5 y 0,75 mg/ml.

La densidad óptica se midió a 540 nm ( $OD_{540nm}$ ).

## ES 2 645 921 T3

### Cálculo

La actividad se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Actividad (u.ml}^{-1} \text{ o u.g}^{-1}) = \frac{T-c}{m} \times A \times \frac{1}{180,16} \times 10^3 \times \frac{1}{V} \times \frac{1}{t} \times D$$

donde:

5  $T = \Delta OD_{540\text{nm}} \text{ PRUEBA}$

$= \Delta OD_{540\text{nm}} \text{ PRUEBA} - OD_{540\text{nm}} \text{ CONTROL}$

$m$  = gradiente de la curva patrón (aproximadamente 1,0)

$c$  = intersección del eje y de la curva estándar (siempre negativo y aproximadamente -0,03)

180,16 = peso molecular de glucosa

10  $10^3 \equiv$  para convertir a  $\mu\text{moles}$

$A \equiv$  volumen de ensayo en ml

$V \equiv$  volumen enzimático en ml

$t \equiv$  tiempo de ensayo en minutos

$D$  = factor de dilución enzimática (por ejemplo, para 1 g diluido a 1 litro  $D = 1000$ )

### 15 Ensayo de arabinasa

#### Principio

20 El ensayo de la actividad de la arabinasa se basa en la determinación colorimétrica midiendo el aumento resultante en los grupos reductores usando un reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico. La actividad enzimática se calculó a partir de la relación entre la concentración de grupos reductores, como equivalentes de arabinosa, y la absorbancia a 540 nm.

El ensayo se llevó a cabo a pH 3,5, pero se puede realizar a diferentes valores de pH para la caracterización y especificación adicionales de enzimas.

#### Definición de la unidad

25 Una unidad de actividad de la arabinasa (actividad de la arabinanasa (endo-1,5-alfa-arabinanasa)) se define como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de arabinosa por minuto en las condiciones del ensayo (pH 3,5 (o como se especifica) y 50°C).

#### Materiales

Mezcla de remolacha azucarera Arabinan

Arabinosa Sigma A3131 P.M.: 150,1

30 Acetato de sodio anhidro 'AnalaR'. Proveedor: Merck Ltd (BDH). N°. producto: 10236. P.M.: 82,03

Ácido acético ("glacial") "AnalaR". Proveedor: Merck Ltd (BDH). N°. producto: 10001. P.M.: 60,05

Ácido 3,5-dinitrosalicílico GPR (ácido 3,5-dinitro-2-hidroxibenzoico). Proveedor: Merck Ltd (BDH). N°. producto: 28235

Peletes de hidróxido sódico 'AnalaR'. Proveedor: Merck Ltd (BDH). N°. producto: 10252. P.M.: 40,00

35 (+)-Tartrato de potasio y sodio 'AnalaR'. Proveedor: Merck Ltd (BDH). N°. producto: 10219. P.M.: 282,22

Solución de Arabinan al 1,5% (solución p/v) en tampón de acetato de sodio 0,1 M, pH 3,5 (solución de sustrato).

Solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). 20 g/l de DNS en un tampón que contenía gránulos de hidróxido sódico 32 g/l y 600 g/l de (+)-tartrato de potasio y sodio.

Solución estándar de arabinasa (0,50 mg/ml)



Procedimiento

Se diluyó la composición enzimática en muestras y se preparó una curva estándar de glucosa utilizando concentraciones de arabinasa de 0, 0,125, 0,25, 0,375 y 0,5 mg/ml.

- 5 0,25 ml de solución de enzima se mezclaron con 1,75 ml de la solución de sustrato (1,5% p/v) a 50°C y la reacción se detuvo después de 10 min por la adición de solución de DNS. Seguido por calentamiento a 95°C durante 5 minutos.

La densidad óptica se midió a 540 nm ( $OD_{540nm}$ ) de las diferentes muestras.

Cálculo

La actividad enzimática se determina a partir de la curva estándar.

- 10 La actividad se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Actividad (u.ml}^{-1} \text{ o u.g}^{-1}) = \frac{T-c}{m} \times A \times \frac{1}{150,13} \times 10^3 \times \frac{1}{V} \times \frac{1}{t} \times D$$

donde:

$T = \Delta OD_{540nm}$  PRUEBA

$= \Delta OD_{540nm}$  PRUEBA -  $OD_{540nm}$  CONTROL

- 15  $m =$  gradiente de la curva patrón (aproximadamente 1,0)

$c =$  intersección del eje y de la curva estándar (siempre negativo y aproximadamente -0,02)

150,13  $\equiv$  peso molecular de arabinasa

$10^3 \equiv$  para convertir a  $\mu$ moles

$A \equiv$  volumen de ensayo en ml

- 20  $V \equiv$  volumen enzimático en ml

$t \equiv$  tiempo de ensayo en minutos

$D =$  factor de dilución enzimática real (por ejemplo, para 1,000 g diluido a 1 litro  $D = 1000$ )

Ensayo de arabinofuranosidasa.

- 25 La reacción, catalizada por la  $\alpha$ -N-arabinofuranosidasa, implica la hidrólisis del enlace terminal, en el resto  $\alpha$ -L-arabinofuranosido no reductor, de  $\alpha$ -L-arabinósidos. La enzima actúa sobre  $\alpha$ -L-arabinofuranosidos,  $\alpha$ -L-arabinanos que contienen enlaces (1,3)- y/o (1,5), arabinoxilanos y arabinogalactanos.

- 30 El ensayo de  $\alpha$ -N-arabinofuranosidasa se basa en la hidrólisis enzimática de p-nitrofenil  $\alpha$ -L-arabinofuranosido. El ensayo es un método de "dos puntos", más que un método de "monitoreo continuo". El cálculo de la actividad enzimática se basa en mediciones realizadas sólo al inicio y al final del período de incubación. Un producto de la reacción, p-nitrofenol se determina colorimetricamente (después del ajuste del pH). La actividad enzimática se calcula a partir de la relación entre la concentración de p-nitrofenol y la absorbancia a 400 nm.

Preparación de la solución enzimática diluida:

- 35 Preparar todas las soluciones enzimáticas, a partir de preparaciones enzimáticas líquidas o en polvo, con agua destilada de vidrio. Minimizar los errores de dilución del ensayo evitando grandes pasos de dilución que involucren pequeños volúmenes o pesos. Al hacer las diluciones enzimáticas, es más preciso, incluso para una muestra líquida, pesar la muestra enzimática inicial. Si se hace esto, en el caso de las muestras de líquido es, por lo tanto, necesario medir la gravedad específica del líquido a 20°C.

- 40 Como el ensayo es un método de "dos puntos", en lugar de un "monitoreo continuo", es importante asegurar la linealidad dentro del período de incubación con diferentes sistemas y condiciones enzimáticas. Bajo las condiciones de ensayo estándar de concentración de sustrato, pH, temperatura y tiempo de ensayo, el ensayo ha demostrado ser lineal en el intervalo  $\Delta OD_{540nm}$  PRUEBA (T) = 0,20-1,50. Sin embargo, para unas buenas prácticas, el ensayo se opera dentro de un intervalo definido de  $\Delta OD_{540nm}$  PRUEBA (T) = 0,400-0,800.

Procedimiento

Cada ensayo de muestra enzimática implica tres análisis: análisis de prueba duplicada (PRUEBA) y un análisis del control (CONTROL). El procedimiento descrito describe el análisis de una muestra de una sola enzima.

	PRUEBA	CONTROL
Tampón de acetato de sodio 0,2M, pH 5,0	1,00 ml	1,00 ml
Agua destilada de vidrio	1, 00 ml	1,00 ml
Solución de p-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosido	1,00 ml	1,00 ml

5 Se añadieron 0,25 ml de solución de enzima diluida a las soluciones a 50°C, se detuvo la reacción después de 10 minutos mediante la adición de 4 ml de una solución de glicina 0,4 M, pH 10,8 (reactivo de parada).

La absorbancia se midió a 400 nm a 25°C contra un control de agua.

- Determinar OD<sub>400nm</sub> PRUEBA para las PRUEBAS duplicadas medidas;
- Determinar OD<sub>400nm</sub> CONTROL.

Cálculos

$$\Delta OD_{400nm} \text{ PRUEBA (T)} = \Delta OD_{400nm} \text{ PRUEBA} - \Delta OD_{400nm} \text{ CONTROL}$$

$$\text{Unidades } (\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}) = \frac{T}{18300} \times \frac{V}{1000} \times 10^6 \times \frac{1}{t}$$

$$\text{Actividad (u} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ o u} \cdot \text{g}^{-1}) = \text{Unidades} \times \frac{1}{E} \times D$$

10

donde: T = OD<sub>400nm</sub> PRUEBA - OD<sub>400nm</sub> CONTROL

18300 = Coeficiente de extinción molar para p-nitrofenol (longitud de trayectoria de 1 cm)

V = 7,25 (volumen total de líquido en ensayo en ml)

t = 10 (minutos)

15 1 u = 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$

E = 0,25 (volumen de la muestra enzimática diluida en ml)

D = Factor de dilución enzimática, p. ej. para 1 ml diluido a 1 litro D = 1000)

Ensayo de celobiohidrolasa.

Principio

20 La reacción, catalizada por celobiohidrolasa, implica la hidrólisis de enlaces 1,4- $\beta$ -D-glucosídicos en celulosa y celotetraosa, liberando celobiosa de los extremos no reductores de las cadenas.

El ensayo de la celobiohidrolasa se basa en la hidrólisis enzimática del p-nitrofenil- $\beta$ -D-celobio-piranosido. El producto de la reacción, p-nitrofenol se determina colorimétricamente (después del ajuste del pH). La actividad enzimática se calcula a partir de la relación entre la concentración de p-nitrofenol y la absorbancia a 400 nm.

25 El ensayo se hace funcionar dentro del intervalo definido lineal de  $\Delta OD_{540nm}$  PRUEBA (T) = 0,400-0,800.

Procedimiento

Cada ensayo de muestra enzimática implica tres análisis: análisis de prueba duplicada (TEST) y un análisis control (CONTROL). El procedimiento descrito describe el análisis de una muestra de una sola enzima.

	PRUEBA	CONTROL
Tampón de acetato de sodio 0,2M, pH 5,0	1,00 ml	1,00 ml
Agua destilada de vidrio	1, 00 ml	1,00 ml

## ES 2 645 921 T3

	PRUEBA	CONTROL
Solución de p-nitrofenil-β-D-celobiopiranosido	1,00 ml	1,00 ml

Se añadieron 0,25 ml de disolución enzimática disuelta a la solución de ensayo a 50°C, después de 30 minutos se añadieron a cada tubo 4 ml de una solución de glicina 0,4 M, pH 10,8 (reactivo de parada).

La absorbancia se midió a 20°C a 400 nm en una cubeta de vidrio de 1 cm contra un control de agua.

• determinar OD400nm PRUEBA para las PRUEBAS duplicadas medidas;

5 • determinar OD400nm CONTROL.

Cálculos

$$\Delta OD_{400nm} \text{ PRUEBA (T)} = \Delta OD_{400nm} \text{ PRUEBA} - \Delta OD_{400nm} \text{ CONTROL}$$

$$\text{Unidades } (\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}) = \frac{T}{18300} \times \frac{V}{1000} \times 10^6 \times \frac{1}{t}$$

Unidades

$$\text{Actividad (u} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ o u} \cdot \text{g}^{-1}) = \text{Unidades} \times \frac{1}{E} \times D$$

donde: T = OD400nm PRUEBA - OD400nm CONTROL

18300 = Coeficiente de extinción molar para p-nitrofenol (longitud de trayectoria de 1 cm)

10 V = 7,25 (volumen total de líquido en ensayo en ml)

1000 = para convertir en litros

10<sup>6</sup> = para convertir en μmoles

t = 30 (minutos)

1 u = 1 μmol·min<sup>-1</sup>

15 E = 0,25 (volumen de la muestra enzimática diluida en ml)

D = Factor de dilución enzimática, p. ej. para 1 ml diluido a 1 litro D = 1000)

La presente descripción también se refiere a los siguientes párrafos numerados:

20 1. Una enzima que exhibe actividad de endo-1,4-β-xilanasas, enzima que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con cualquiera seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 17, y SEQ ID NO: 18, o cualquier fragmento funcional de las mismas.

25 2. La enzima según el párrafo 1, enzima que tiene una relación en la actividad sobre el sustrato de arabinosilano soluble (WE-AX) frente al sustrato de arabinosilano insoluble (WU-AX) de menos de aproximadamente 7,0, tal como menos de aproximadamente 6,5, tal como menos de aproximadamente 6,0, tal como menos de aproximadamente 5,5, tal como menos de aproximadamente 5,0, tal como menos de aproximadamente 4,5.

3. Una enzima que exhibe actividad de endo-1,3(4)-β-glucanasa, enzima que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con cualquiera seleccionada de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o cualquier fragmento funcional de las mismas.

30 4. La enzima de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 3, enzima que tiene una temperatura óptima en el intervalo de 40-70°C, tal como en el intervalo de 45-65°C, tal como en el intervalo de 50-65°C, tal como en el intervalo de 55-65°C.

35 5. La enzima de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-4, en la que dicha enzima tiene al menos 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 1-18, o cualquier fragmento funcional de las mismas.

6. La enzima de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 5 que tiene un número total de aminoácidos inferior a 350, tal como menor que 340, tal como menos de 330, tal como menos de 320, tal como menos de 310, tal como

menos de 300 aminoácidos, tal como en el intervalo de 200 a 350, tal como en el intervalo de 220 a 345 aminoácidos.

- 5 7. La enzima de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-6, en la que la secuencia de aminoácidos de dicha enzima tiene al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos en comparación con cualquier secuencia de aminoácido seleccionada de SEQ ID NO: 1-18, o cualquier fragmento funcional de las mismas.
- 10 8. La enzima de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 7, en la que la secuencia de aminoácidos de dicha enzima tiene un máximo de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos en comparación con cualquiera de la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1-18, o cualquier fragmento funcional de las mismas.
9. La enzima de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 8, enzima que comprende la secuencia de aminoácidos identificada por cualquiera de las SEQ ID NO: 1-18, o cualquier fragmento funcional de las mismas.
10. La enzima de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 ó 3, enzima que consiste en la secuencia de aminoácidos identificada por cualquiera de las SEQ ID NO: 1-18, o cualquier fragmento funcional de las mismas.
- 15 11. Una construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica una enzima de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-10.
12. Un vector de expresión recombinante que comprende una construcción de ADN de acuerdo con el párrafo 11.
13. Una célula que se ha transformado con una construcción de ADN del párrafo 11 o el vector del párrafo 12.
- 20 14. Una preparación que comprende una enzima de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-10, o una construcción de ADN de acuerdo con el párrafo 11, o un vector según el párrafo 12, o una celda de acuerdo con el párrafo 13.
15. Una composición que comprende una enzima que exhibe actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1, 2, 4-10 en combinación con una o más  $\beta$ -glucanasas.
16. La composición según el párrafo 15, en la que dicha una o más  $\beta$ -glucanasa es una enzima que exhibe actividad de endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanasa de acuerdo con cualquiera de los párrafos 3-10.
- 25 17. Una composición que comprende una enzima que exhibe actividad de endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanasa de acuerdo con cualquiera de los párrafos 3-10 en combinación con una o más xilanasas.
18. La composición de acuerdo con el párrafo 17, en la que dicha una o más xilanasas es una enzima que exhibe actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1, 2, 4-10.
- 30 19. La composición de acuerdo con cualquiera de los párrafos 15-18, en la que dicha actividad de endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanasa y dicha actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas se derivan de al menos dos enzimas diferentes, tales como al menos dos diferentes enzimas de dos especies diferentes.
20. La composición de acuerdo con cualquiera de los párrafos 15-19, que comprende una combinación de al menos dos enzimas, dichas dos enzimas, o las dos enzimas con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID respectiva, o cualquier fragmento funcional de las mismas, que se seleccionan de la lista que consta de:
- 35 SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 7;
- SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 7;
- SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 7;
- SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 7;
- 40 SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7;
- SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7;
- SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 7;
- SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 7;
- SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 8;
- 45 SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 8;

- SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 8;
- SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 8;
- SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 8;
- SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8;
- 5 SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 8;
- SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 8;
- SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 9;
- SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 9;
- SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 9;
- 10 SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 9;
- SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 9;
- SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 9;
- SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 9;
- SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 9;
- 15 SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 10;
- SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10;
- SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 10;
- SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 10;
- SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 10;
- 20 SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 10;
- SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 10;
- SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 10;
- SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 11;
- SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 11;
- 25 SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 11;
- SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 11;
- SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 11;
- SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 11;
- SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 11;
- 30 SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 11;
- SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 12;
- SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 12;
- SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 12;
- SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 12;
- 35 SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 12;
- SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 12;
- SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 12;

- SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 12;
- SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 13;
- SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 13;
- SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 13;
- 5 SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 13;
- SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 13;
- SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 13;
- SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 13;
- SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 13;
- 10 SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 14;
- SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 14;
- SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 14;
- SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 14;
- SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 14;
- 15 SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 14;
- SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 14;
- SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 14;
- SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 15;
- SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 15;
- 20 SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 15;
- SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 15;
- SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 15;
- SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 15;
- SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 15;
- 25 SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 15;
- SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 16;
- SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 16;
- SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 16;
- SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 16;
- 30 SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 16;
- SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 16;
- SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 16; y
- SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 16.

35 21. La composición de acuerdo con cualquiera de los párrafos 15-20, en la que cuando se usa antes de la filtración en una aplicación de producción de cerveza la presión total acumulada se reduce a un valor de menos de 470 mm de WC, tal como menos de 450 mm de WC, tal como menos de 430 mm de WC, tal como menos de 410 mm de WC, tal como menos de 390 mm de WC, tal como menos de 370 mm de WC, tal como menos de 350 mm de WC, tal como menos de 330 mm de WC, tal como menos de 310 mm de WC, tal como menos de 300 mm de WC, tal como menos de 290 mm de WC.

22. La composición de acuerdo con cualquiera de los párrafos 15-21, en la que cuando se usa antes de la filtración en una aplicación de producción de cerveza la presión total acumulada se reduce en al menos 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93 ó 95% en comparación con el uso de un control negativo sin dicha composición.
- 5 23. La composición de acuerdo con cualquiera de los párrafos 15-22, en la que cuando se usa en una aplicación de producción de cerveza antes a la separación del mosto, la filtrabilidad del mosto medida por el volumen de mosto recogido después de 5 min de filtración con relación a un control sin enzimas se incrementa por encima de 1,5, tal como por encima de 1,6, tal como por encima de 1,7, tal como por encima de 1,8, tal como por encima de 1,9, tal como por encima de 2,0, tal como por encima de 2,1, tal como por encima de 2,2, tal como por encima de 2,3, tal como por encima de 2,4, tal como por encima de 2,5.
- 10 24. La composición de acuerdo con cualquiera de los párrafos 15 a 23, cuando se usa en una aplicación de producción de cerveza antes de la separación del mosto, la filtrabilidad del mosto medida por el volumen de mosto recogido después de 5 min de filtración se incrementa al menos 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 o 300% en comparación con el uso de un control negativo sin dicha composición.
- 15 25. La composición de acuerdo con cualquiera de los párrafos 15-24, que comprende una o más enzimas adicionales.
- 20 26. La composición de acuerdo con el párrafo 25, en la que dicha una o más enzimas adicionales se seleccionan de la lista consistente en una xilanasa clasificada en EC 3.2.1.32, EC 3.2.1.136 o EC 3.2.1.156, una celulasa, una laminarinasa, una endo-1,5-a-L-arabinanasa, una beta-D-glucosida glucohidrolasa, una  $\beta$ -xilosidasa, una celobiohidrolasa, una glucano 1,4-beta-glucosidasa, una exo-beta-1,4-glucanasa específica de xiloglucano y una a-N-arabinofuranosidasa.
- 25 27. El uso de una enzima de acuerdo con los párrafos 1-10, o una preparación de acuerdo con el párrafo 14, o una composición de acuerdo con cualquiera de los párrafos 15-26 en la producción de un producto de alimentación, pienso o bebida de malta.
28. El uso de una enzima de acuerdo con los párrafos 1-10, o una preparación de acuerdo con el párrafo 14, o una composición de acuerdo con cualquiera de los párrafos 15-26, en la producción de masa o productos horneados.
- 30 29. El uso de una enzima de acuerdo con los párrafos 1-10, o una preparación de acuerdo con el párrafo 14, o una composición de acuerdo con cualquiera de los párrafos 15-26, en la preparación de pulpa o papel.
30. El uso de una enzima de acuerdo con los párrafos 1-10, o una preparación de acuerdo con el párrafo 14, o una composición de acuerdo con cualquiera de los párrafos 15-26, para la preparación de componentes de cereales.
31. El uso según el párrafo 29, en el cual el cereal es centeno, trigo o cebada.
- 35 32. El uso de la enzima de acuerdo con los párrafos 1-10, o una preparación de acuerdo con el párrafo 14, o una composición de acuerdo con cualquiera de los párrafos 15-26, en la producción de cerveza o modificación de subproductos de un proceso de producción de cerveza.
33. El uso de la enzima de acuerdo con los párrafos 1-10, o una preparación de acuerdo con el párrafo 14, o una composición de acuerdo con cualquiera de los párrafos 15-26, en la producción de vino o jugo.
- 40 34. El uso de la enzima de acuerdo con los párrafos 1-10, o una preparación de acuerdo con el párrafo 14, o una composición según uno cualquiera de los párrafos 15-26, en la producción de un biocombustible de primera o segunda generación, tal como el bioetanol.
35. El método para alterar la filtrabilidad de un material que comprende almidón, comprendiendo dicho método la etapa de tratar dicho material que comprende almidón con la enzima de acuerdo con los párrafos 1-10, o una preparación de acuerdo con el párrafo 14, o una composición de acuerdo con cualquiera de los párrafos 15-26.
- 45 36. El método para reducir la presión acumulada durante la filtración en una aplicación de producción de cerveza, comprendiendo dicho método la etapa de tratar una masa fermentada con enzima de acuerdo con los párrafos 1-10, o una preparación de acuerdo con el párrafo 14, o una composición de acuerdo con cualquiera de los párrafos 15-26.
- 50 37. El método para la producción de un alimento, pienso o bebida, tal como una bebida alcohólica o no alcohólica, tal como una bebida a base de cereales o de malta tal como cerveza o whisky, comprendiendo dicho método la etapa de tratar un material que comprende almidón con la enzima de acuerdo con los párrafos 1-10, o una preparación de acuerdo con el párrafo 14, o una composición de acuerdo con cualquiera de los párrafos 15-26.

38. El método para la producción de una masa para cerveza, comprendiendo dicho método la etapa de tratar un material que comprende almidón con la enzima de acuerdo con los párrafos 1-10, o una preparación de acuerdo con el párrafo 14, o una composición de acuerdo con cualquiera de los párrafos 15-26.

5 39. El método para la producción de un biocombustible de primera o segunda generación, tal como bioetanol, comprendiendo dicho método la etapa de tratar un material que comprende almidón con una enzima de acuerdo con los párrafos 1-10, o una preparación de acuerdo con el párrafo 14, o una composición de acuerdo con cualquiera de los párrafos 15-26.

40. El producto obtenido por el método de acuerdo con cualquiera de los párrafos 38-39.

10 41. Una composición que comprende el producto de acuerdo con el párrafo 40, tal como aquella en la que el producto está en un intervalo de 0,1% a 99,9%.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Métodos y resultados en relación con la presentación de xilanasas/glucanasas para la aplicación de la producción de cerveza.

15 Los siguientes métodos se han utilizado para detectar xilanasas y glucanasas con aplicación en la elaboración de la cerveza:

Métodos:

Método de arabinoxilano (WE-AX) xilanasas extraíbles con agua:

20 Se preparan en agua destilada muestras, para obtener aprox. OD540 = 0,25-0,30 en este ensayo y estándares de xilosa (0, 0,125, 0,250, 0,375 y 0,500 mg/ml de agua destilada). En el tiempo  $t = 0$  minutos, se coloca en un tubo de ensayo a 50°C 1,75 ml de arabinoxilano de trigo soluble (arabinoxilano de trigo al 0,5% (PWAXYH, Megazyme, Bray, Irlanda)) en acetato de sodio 0,1 M/ácido acético, pH 5). En el tiempo  $t = 5$  minutos, se añade una solución enzimática de 250  $\mu$ l al sustrato a 50°C seguido de mezcla. El agua destilada se utiliza como control. En el tiempo  $t =$   
25 15 minutos, se añaden 2 ml de solución de DNS (1% de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), 1,6% de hidróxido de sodio, 30% de tartrato sódico de potasio en agua destilada) y 2,0 ml de solución patrón. Las muestras, los controles y los patrones añadidos a DNS se colocan en un baño de agua hirviendo (95°C) durante 5 minutos. A continuación, las muestras, los controles y los patrones se enfrían colocándolos en un baño de agua a 25°C durante 20 minutos. La densidad óptica de todas las muestras se lee a OD540 usando un espectrofotómetro. En base a la dilución de las muestras, la cantidad de muestra en relación a las muestras de trabajo y los patrones, se puede calcular la actividad  
30 de las xilanasas de la muestra.

Una unidad de actividad de endo-1,4-beta-xilanasas WE-AX se define como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu$ mol de equivalentes de xilosa por minuto en las condiciones mencionadas anteriormente (método de arabinoxilano (WE-AX) xilanasas extraíbles con agua).

Método de arabinoxilano xilanasas (WU-AX) no extraíbles en agua:

35 Las muestras se preparan en agua destilada. En el tiempo  $t = 0$  minutos, se coloca en un tubo de ensayo a 50°C 1,75 ml de trigo insoluble (0,5% de arabinoxilano de trigo (PWAXYI, Megazyme, Bray, Irlanda)) en acetato sódico 0,1M/ácido acético, pH 5). En el tiempo  $t = 5$  minutos, se añade una solución enzimática de 250  $\mu$ l al sustrato a 50°C seguido de mezcla. El agua destilada se utiliza como control. En el tiempo  $t = 15$  minutos, las muestras y los controles se colocaron en un baño de agua hirviendo (95°C) durante 5 minutos.

40 A continuación, las muestras y los controles se centrifugan para precipitar el sustrato insoluble residual. La cantidad de arabinoxilano en solución se determina utilizando el método descrito por Rouau, X. y Surget, A. (1994), Carbohydrate Polymers, 24, 123-132.

45 La actividad de endo-1,4-beta-xilanasas WU-AX se define como la cantidad de pentosas solubilizadas ( $\mu$ g de pentosa) en las condiciones descritas anteriormente dando una definición unitaria de  $\mu$ g de pentosa/gramo de muestra de xilanasas.

Ensayo de actividad de xilanasas

50 Se preparan en agua destilada muestras, para obtener aprox. OD540 = 0,25-0,30 en este ensayo y patrones de xilosa (0, 0,125, 0,250, 0,375 y 0,500 mg/ml de agua destilada). En el tiempo  $t = 0$  minutos, se coloca en un tubo de ensayo a 50°C 1,75 ml de arabinoxilano de trigo soluble (0,5% de arabinoxilano de trigo (PWAXYH, Megazyme, Bray, Irlanda)) en acetato de sodio 0,1 M/ácido acético, pH 5). En el tiempo  $t = 5$  minutos, se añade una solución enzimática de 250  $\mu$ l al sustrato a 50°C seguido de mezcla. El agua destilada se utiliza como control. En el tiempo  $t =$   
15 minutos, se añaden 2 ml de solución de DNS (1% de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), 1,6% de hidróxido de



5 sodio, 30% de tartrato sódico de potasio en agua destilada) a la solución enzima-sustrato y 2,0 ml de solución patrón. Las muestras, los controles y patrones añadidos a DNS se colocan en un baño de agua hirviendo (95°C) durante 5 minutos. A continuación, las muestras, los controles y los patrones se enfrían colocándolas en un baño de agua a 25°C durante 20 minutos. La densidad óptica de todas las muestras se lee a OD540 usando un espectrofotómetro. Sobre la base de la dilución de las muestras, la cantidad de toma de muestra de trabajo y los patrones, se puede calcular la actividad de las xilanasas de la muestra.

Una unidad de actividad de endo-1,4-beta-xilanasas WE-AX se define como la cantidad de enzima que produce 1 µmol de equivalentes de xilosa por minuto en las condiciones mencionadas anteriormente.

#### Ensayo de actividad de glucanasa

10 Las muestras, para obtener OD540 dentro de la curva estándar en este ensayo y los patrones de glucosa (0, 0,125, 0,250, 0,500 y 0,750 mg/ml de agua destilada) se preparan en agua destilada. En el tiempo  $t = 0$  minutos, se colocan en un tubo de ensayo a 50°C 1,75 ml de beta-glucano de cebada (1,5% de beta-glucano de cebada (P-BGBM, Megazyme, Bray, Irlanda)) en acetato sódico 1M/ácido acético, pH 5). En el tiempo  $t = 5$  minutos, se añade una solución enzimática de 250 µl al sustrato a 50°C seguido de mezcla. El agua destilada se utiliza como control. En el tiempo  $t = 15$  minutos, se añaden 2 ml de solución de DNS (1% de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), 1,6% de hidróxido de sodio, 30% de tartrato sódico de potasio en agua destilada) a la solución de enzima-sustrato y a 2,0 ml solución patrón. Las muestras, los controles y los patrones añadidos a DNS se colocan en un baño de agua hirviendo (95°C) durante 15 minutos. A continuación, las muestras, los controles y los patrones se enfrían colocándolos en un baño de agua a 25°C durante 20 minutos. La densidad óptica de todas las muestras se lee a OD540 usando un espectrofotómetro. Sobre la base de la dilución de las muestras, la cantidad de toma de muestra de trabajo y los patrones, se puede calcular la actividad de glucanasa de la muestra.

Una unidad de actividad de endo-1,3(4)-β-glucanasa se define como la cantidad de enzima que produce 1 µmol de equivalentes de glucosa por minuto en las condiciones del ensayo (pH 5,0 (o como se especifica) y 50°C).

#### Método de aplicación de producción de cerveza a escala de laboratorio:

25 Se llevaron a cabo estudios de aplicación de la producción de cerveza a escala de laboratorio utilizando malta Pilsner: cebada en una proporción de 75:25 en una proporción de agua:molienda de 3:1 (150 ml:50 g de molienda). Inicialmente se precalentó el agua a 53°C antes de la trituración y el ajuste del pH (5,4, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M). Después de recuperar la temperatura inicial (período de 10 minutos) se inicia el perfil de maceración (véase la figura 1) y se añaden enzimas. Después de purgar el mosto se realiza la separación utilizando un embudo de plástico convencional y papel de filtro (filtro de papel nº 1, 24 cm de diámetro, Whatman, Inglaterra). Se evaluó el rendimiento de la filtración así como varios otros parámetros del mosto, tales como, por ej., la viscosidad, β-glucano y pentosano.

La filtración del mosto se midió durante 30 minutos después de lo cual se terminó la filtración. El mosto recogido se enfrió antes de cualquier análisis posterior.

#### Filtración

35 Los datos de filtración se presentan como un mosto de volumen recogido después de 5, 10, 15 y 30 minutos con respecto a un control (elaboración de cerveza sin enzimas exógenas añadidas).

#### Preparación de cerveza a escala piloto

Los ensayos se llevaron a cabo en una instalación de producción de cerveza piloto (capacidad de 2 HL). La separación del mosto se realizó por aclarado y filtración de la cerveza por filtración horizontal de kiselguhr.

40 Para elucidar la optimización de la filtración por combinación de glucanasa y xilanasas bajo condiciones de producción de cerveza "exigentes", las rutas de producción de cerveza a escala piloto se llevaron a cabo usando una mezcla de molienda compuesta de 75% de malta y 25% de cebada. Inicialmente, la proporción agua:molienda se fijó en 2,8:1 (inicio de masa) aumentando a 3,1:1 al comienzo del aclarado. En comparación las proporciones agua:molienda alrededor de 3,2-3,8 son típicos del aclarado doméstico de la producción de cerveza a escala completa. Por lo tanto, se cree que los actuales ajustes de prueba piloto de una proporción de agua:molienda de 3,1:1 están en el extremo exigente de la escala.

La malta y la cebada se molieron en seco usando un molino de dos rodillos. Tanto la cebada como la malta se molieron dos veces utilizando una distancia de rodillos de ~ 0,7 mm.

50 Se llevó a cabo el machacado con el objetivo de una temperatura inicial de la mezcla de 53°C. Después de la maceración se realizaron pequeños ajustes tales como: ajuste del volumen de la mezcla para la proporción de agua:molienda de 2,8:1 y ajuste del pH a ~ 5,56 (ácido láctico). Después de afinar la mezcla, se añadió la enzima y se siguió el perfil de maceración dado en la figura 1. El resto de la sacarificación a 70°C se programó a 15 min, sin embargo el período del resto se prolongó 5 minutos hasta que un ensayo de yodo demostró que no había almidón

presente. (Ludwig Narziss y Werner Back, Technische Universitaet Muenchen (Fakultaet fuer Brauwesen, Weihenstephan), Abriss der Bierbrauerei. WILEY-VCH Verlags GmbH Weinheim, Alemania, 2005).

5 La purga de masa se inició después de un reposo de 5 minutos a 78°C. El puré se transfirió al Lauter Tun, que previamente estaba lleno de agua a una altura justo debajo del "fondo falso". La masa se dejó reposar durante 5 minutos para la sedimentación de la torta de filtración. A esto siguió una recirculación de 15 min (140 L/h) que asegura la sedimentación de la torta del filtro y la clarificación del mosto. Típicamente, en la preparación de cerveza a gran escala, la filtración se iniciará cuando se obtenga una turbidez del mosto dada, sin embargo en los ensayos actuales la recirculación se mantuvo constante a los 15 minutos permitiendo la comparación de los ensayos. Durante el aclarado se recogieron los datos siguientes, incluyendo el tiempo (min), el volumen de mosto recogido (L), la diferencia de presión de filtración a través de la torta del filtro (mmWC, mm de columna de agua), la capacidad de la bomba (%), la turbidez del mosto DO) y temperatura de la mezcla (°C).

15 La acumulación de presión a través de la torta de filtración durante la filtración se cree que es un factor que contribuye a establecer el estándar del rendimiento del aclarado del mosto. Alcanzando diferencias de presión muy altas - p. ej. 250 mmWC durante la primera recolección del mosto y, p. ej., 450 mmWC para el resto del aclarado - se induce una decantación de la torta del filtro (también conocida como corte profundo). La decantación es un proceso en el que una torta de filtro se desintagra o se alivia la formación de un canal de filtración reduciendo la velocidad de corte de la torta de filtración con cuchillos especialmente diseñados. Después de la decantación de la torta de filtro, se introdujo una recirculación de mosto de 6 minutos (caudal: 120 l/h), cebando la torta de filtro para una filtración continua. La decantación de la torta del filtro alivia un funcionamiento de filtración diverso comprometido que de otra manera también resultaría en una mala calidad del mosto. Si no se ha introducido ninguna decantación inducida por presión al comienzo del tercer rociado, se realizan decantaciones automáticas al principio del 3º y 4º rociado para asegurar que no se produce un bloqueo completo de la filtración justo antes de terminar la separación del mosto.

El aclarado se realizó con los ajustes ilustrados en la tabla 1.

Tabla 1. Configuración del aclarado. Volúmenes recogidos (L), flujo de filtración (L/h) y volúmenes de dispersión (L).

Mosto	Volumen recuperado, L	Flujo de filtración, L/h	Volumen de dispersión, L
Primer mosto	0-60	130	
1ª dispersión	60-78	140	18
2ª dispersión	78-96	160	18
3ª dispersión	96-114	180	18
4ª dispersión	114-140	180	26

25 Después del aclarado final, el mosto dulce se devolvió al Mash Tun, se calentó hasta ebullición y se añadieron lúpulos. La adición de lúpulo se continuó durante 80 minutos y al final de la adición del lúpulo el pH se ajustó a 5,10 ± 0,05. El lúpulo se despejó del mosto amargo mediante el uso de remolinos y el mosto siguiente se enfrió a ~ 8°C. Para la producción de cerveza, se seleccionó una levadura seca fermentante inferior (*Saccharomyces cerevisiae*) W34/70 de Fermentis. La levadura se rehidrató durante 30 min y se introdujo a 100 g/HL. La fermentación principal se mantuvo durante 5-6 días a 10°C, seguido por maduración a 15°C hasta atenuarse y Diacetil por debajo de 80 ppb. La cerveza se almacenó durante otras 2-3 semanas a 1°C y 0,7 bar antes de filtrar.

35 La cerveza se filtró horizontalmente mediante el uso de placas de velas PP de 1,2 µm y kieselguhr. Se pueden incluir hasta 8 placas en la unidad de filtración, dando como resultado un área de filtración total de ~ 0,5 m<sup>2</sup>. En los estudios actuales se incluyeron 3 placas y se realizó la filtración a un caudal de 130 l/h, dando como resultado una velocidad de filtración de 6,9 HL/(h·m<sup>2</sup>). En las cervecerías a gran escala, la velocidad de filtración se suele establecer entre 5-7 HL/(h·m<sup>2</sup>). Por lo tanto, es obvio que los ajustes actuales están en el extremo superior - una elección deliberada desafiando las condiciones de filtración de la cerveza para verificar los beneficios potenciales de la elección de utilizar una enzima en el proceso de elaboración de la cerveza. Durante la filtración de la cerveza, se controlaron los caudales (L/h) así como los valores de presión (P-entrada y P-salida) para verificar el rendimiento de la filtración de la cerveza. También se realizaron varios análisis de la cerveza, tales como gravedad original (OG), extracto aparente (AE), alcohol por volumen (ABV), grado aparente de fermentación (ADF), grado real de fermentación (RDF), pH, color y amargor para evaluar la calidad de la cerveza.

Resultados:

Xilanasas:

45 Las xilanasas se examinaron en cuanto a su actividad sobre sustrato soluble e insoluble, sus características de pH y temperatura.

Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Xilanasas examinadas, su actividad sobre sustrato de arabinosilano soluble (WE-AX) e insoluble (WU-AX) y sus características bioquímicas en cuanto a temperatura y pH.

Nombre	Origen	GH	WE-AX	WU-AX	WU-AX/WE-AX	Temp opt, °C	temp T <sup>1/2</sup> , °C	pH opt.
AfuXyn2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	11	7798	68790526	8822	65	59	5,5
AfuXyn3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	11	26283	99716865	3794	60	62	5
AfuXyn5	<i>Aspergillus fumigatus</i>	11	90005	714363158	7937	60	50	4
BsuXyn3	<i>Bacillus subtilis</i> , BS3	11	82	1095357	13388	50	n. d.	6
BsuXyn4	<i>subtilis</i> , BS4 n°. 160	11	54	1005400	18619	50	n. d.	6
TerXyn1	<i>Geosmithia emersonii</i>	10	1467	6208786	4232	78	>78	3
AtuXyn3	<i>Aspergillus tubigensis</i>	10	1220	7760982	6361	65	67	4,5
AtuXyn4	<i>Aspergillus tubigensis</i>	11	1600	12934971	8084	45	58	5
AacXyn2	<i>Aspergillus aculeatus</i>	10	777	3880491	4994	70	73	4
TreXyn2	<i>Trichoderma reesei</i>	11	2244	16015846	7137	55	n. d.	5
TreXyn3	<i>Trichoderma reesei</i>	10	21487	141108772	6567	60	64	5,5
TreXyn5	<i>Trichoderma reesei</i>	11	1410	8842816	6272	70	68	5
n.d. = No determinado								

Las actividades de las enzimas WE-AX y WU-AX (U) se midieron como se describe en las secciones "método de arabinosilano xilanasas extraíble con agua (WE-AX)" y "método de arabinosilano xilanasas no extraíble con agua (WU-AX)".

5

Basándose en los resultados del cribado bioquímico, se seleccionaron xilanasas que tenían una relación de actividad apropiada en arabinosilano soluble frente a insoluble para ensayos adicionales en ensayos de aplicación. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Las xilanasas se seleccionaron y el rendimiento relativo del extracto se obtuvo usando las xilanasas frente a un control (sin xilanasas). Finalmente, la especificidad del sustrato de xilanasas se ilustra como una relación de su actividad sobre el arabinosilano insoluble frente a soluble (WU-AX/WE-AX).

10

Nombre	Origen	Rendimiento de Filtración				WU-AX/WE-AX
		5 min	10 min	15 min	30 min	
Control		1,00	1,00	1,00	1,00	
BsuXyn3	<i>Bacillus subtilis</i> , BS3	0,93	0,95	0,96	0,95	13388
BsuXyn4	<i>Bacillus subtilis</i> , BS4 n°. 160	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	18619

Nombre	Origen	Rendimiento de Filtración				WU-AX/WE-AX
		5 min	10 min	15 min	30 min	
TerXyn1	Geosmithia emersonii (Talaromyces emersonii)	2,19	1,92	1,70	1,44	4232
AtuXyn3	Aspergilo tubigensis	2,06	1,75	1,59	1,37	6361
AtuXyn4	Aspergilo tubigensis	1,02	1,01	1,01	1,01	8084
AacXyn2	Aspergilo aculeatus	2,07	1,86	1,67	1,43	4994
TreXyn3	Trichoderma reesei	2,41	2,02	1,81	1,55	6567
TreXyn5	Trichoderma reesei	2,06	1,75	1,59	1,37	6272

El rendimiento de filtración se midió como se describió anteriormente ("filtración"), y se presenta como un volumen de filtrado en los diferentes puntos temporales con respecto al control negativo (control).

Las actividades de las enzimas WE-AX y WU-AX (U) se midieron como se describe en las secciones "método de arabinoxilano xilanasa extraíble con agua (WE-AX)" y "método de arabinoxilano xilanasa no extraíble con agua (WU-AX)".

5

Glucanasas:

Las glucanasas se seleccionaron en cuanto a sus características de actividad y temperatura, y los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Glucanasas seleccionadas, su actividad y sus características bioquímicas con respecto a la temperatura

Nombre	Origen	U/ml	Temp opt, °C	temp_tampón T½, °C	temp_mosto T½, °C	pH opt.
TerGlu1	Talaromyces emersonii/Geosmithia emersonii	7338	70	78	78	3
BsuGluS	Bacillus subtilis	208	55-65	60	68	5-6
BsuGlu103FULL	Bacillus subtilis	391	50-60	53	58	5-6
TreGlu2	Trichoderma reesei	13	40-50	70	74	4,5-6
TreGlu3	Trichoderma reesei	9215	40-51	58	62	4,5-6
TreGlu4	Trichoderma reesei	n.d.	40-52	62	62	4,5-6
TreGlu6	Trichoderma reesei	n.d.	40-53	62	64	4,5-6
TreGlu7	Trichoderma reesei	n.d.	40-54	62	62	4,5-6
TreGlu8	Trichoderma reesei	n.d.	40-55	61	63	4,5-6
BsuGluC CBD	Bacillus subtilis	10	50-60	60	67	5-6
n.d. = No determinado						

10 La actividad/unidades de glucanasa se determinó como se describe en el ensayo de actividad de glucanasa como se ha descrito anteriormente.

Basándose en los resultados de la selección bioquímica, se eligieron las glucanasas que tienen las características adecuadas para ensayos adicionales en los ensayos de aplicación. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Nombre y origen de las glucanasas seleccionadas y el rendimiento relativo del extracto obtenido utilizando las glucanasas frente a un control (sin enzima).

Nombre	Origen	Rendimiento de filtración			
		5 min	10 min	15 min	30 min
Control	Control Neg	1,00	1,00	1,00	1,00
TerGlu1	<i>Geosmithia emersonii</i>	1,36	1,43	1,46	1,36
BsuGluS	<i>Bacillus subtilis</i>	1,48	1,49	1,48	1,35
BsuGlu103FULL	<i>Bacillus subtilis</i>	1,29	1,28	1,30	1,22
TreGlu2	<i>Trichoderma reesei</i>	1,15	1,18	1,20	1,15
TreGlu3	<i>Trichoderma reesei</i>	1,29	1,32	1,30	1,22
TreGlu4	<i>Trichoderma reesei</i>	1,11	1,11	1,11	1,09
TreGlu6	<i>Trichoderma reesei</i>	1,13	1,15	1,13	1,10
TreGlu7	<i>Trichoderma reesei</i>	1,06	n.d.	1,01	1,02
TreGlu8	<i>Trichoderma reesei</i>	1,12	1,11	1,13	1,09
BsuGluC CBD	<i>Bacillus subtilis</i>	1,33	1,37	1,37	1,32

El rendimiento de filtración se midió como se describió anteriormente ("filtración"), y se presenta como un volumen de filtrado en los diferentes puntos temporales con respecto al control negativo (control).

- 5 Basándose en la selección individual de xilanasas y glucanasas, se realizaron experimentos combinatorios, y los resultados se ilustran en la tabla 6.

Tabla 6. Los resultados de la aplicación de la elaboración de la cerveza se obtienen a partir de experimentos combinatorios de xilanasas y glucanasas versus un control y frente a UltraFlo® Max. 250 Unidades fúngicas de xilanasas FXU-S/g; 700 Unidades de celulasa EGU/g (Novozymes, Dinamarca). Los resultados se ilustran como el rendimiento del extracto relativo obtenido.

Nombre	Origen	Rendimiento de la filtración			
		5 min	10 min	15 min	30 min
Control		1,00	1,00	1,00	1,00
UFmax 0,1	<i>A. aculeatus</i>	2,29	2,13	2,00	1,77
BsuGluS/TauXyn1	<i>B. sub/T. aurantiacus</i>	1,70	1,69	1,60	1,47
BsuGluS/AtuXyn3	<i>B. sub/A. tubingensis</i>	2,57	2,14	1,96	1,75

(El origen de UltraFlo® Max puede incluir otros microorganismos que *A. aculeatus*, tal como se describe en el documento WO05059084)

El rendimiento de filtración se midió como se describió anteriormente ("filtración"), y se presenta como un volumen de filtrado en los diferentes puntos temporales con respecto al control negativo (control).

- 15 Las combinaciones adecuadas se ensayaron adicionalmente en una instalación a escala piloto 2HL para su verificación, y los resultados se muestran en la tabla 7 y la figura 3.

Tabla 7. La aplicación de la elaboración de la cerveza a escala piloto resulta de la verificación de la selección de glucanasa y xilanasas. La B. sub glucanasa S combinada con las xilanasas A. tub se ensayaron contra un control y UltraFlo® Max. Los datos recogidos fueron el caudal medio (L/h), la acumulación de presión total sobre el aclarado (mm de WC) y la presión máxima registrada durante el aclarado (mm de WC).

ID	Caudal medio (L/h)	Acumulación total de la presión (mm WC)	Presión máxima (mm WC)
Control	148	556	356
UltraFlo max	149	478	280
BsuGluS/AtuXyn3	147	263	163

20

Ejemplo 2

5 En este ejemplo se intentó demostrar que las xilanasas para aplicaciones de producción de cerveza pueden tener una selectividad muy alta para el Arabinoxilano Soluble en Peso Molecular Alto (HMWS-AX) y el arabinoxilano extraíble con agua (WE-AX). Se cree que por este medio sólo cantidades limitadas de arabinoxilano necesitan solubilizarse. Consecuentemente, el potencial de aroma relacionado es altamente reducido.

Una viscosidad significativamente reducida facilita la separación de la pasta y la cerveza. Las características de xilanasa deseadas para aplicaciones de elaboración de la cerveza pueden incluir uno o más de los siguientes aspectos de la tabla 8:

Tabla 8: Criterios de selección para la selección de xilanasas
Especificidad del sustrato enzimático La relación WE-AX/WU-AX tiene un impacto en la viscosidad
Selectividad del sustrato enzimático Cómo de cerca de los puntos de ramificación la enzima que cortará tiene un impacto sobre la funcionalidad
Termoestabilidad enzimática La solubilización continua del AX durante el amasado - la termoestabilidad es una característica clave
PH óptimo de la enzima (pH 5,4-5,6)
Inhibición enzimática (por ejemplo, factor clave conocido para las xilanasas)

Tabla 9: Características bioquímicas de las xilanasas Inhibición por inhibidores de xilanasas de cereales endógenos ocurren en ambas GH xilanasas		
Xilanasas GH	GH10	GH11
PM	+ 30 kDa	20 kDa
Especificidad de sustrato	Hidroliza cerca de sustituciones de Arabinosa	Necesita más Xilosa no sustituida para hidrolizar AX
Selectividad de Sustrato	WE-AX/WU-AX típicamente > 1	WE-AX/WU-AX típicamente < 1
SBD	SBD a menudo separado	SBD no clásico, pero BD secundario en superficie
Efecto tecnológico	Reductores de viscosidad	Reductores de solubilizante/viscosidad

10 El ArabinoXilano insoluble en agua (WU-AX) en cereales, como se muestra en la figura 3, está ligado a la estabilidad de la torta de filtración en la instalación de la preparación de cerveza.

15 La concentración de ácido ferúlico (FA) en los cereales depende en gran medida del tejido. La concentración más alta se encuentra en el material del pericarpio, mientras que la concentración en el endosperma es mucho menor. Se informan diferentes concentraciones. Es probable que exista una concentración de 2700 µg/g de fibra insoluble, 185 µg/g de fibra soluble (Bunzel et al., 2001, Journal of Sc. Of Food and Agriculture, vol. 81, p. 653-60).

Para poner esto en perspectiva, esto significa que la FA sólo se encuentra por cada 200a moléculas de xilosa en el arabinoxilano en la fibra insoluble (WU-AX) y por cada 2500 xilosa en la fibra soluble (WE-AX).

Es un hecho bien conocido que las xilanasas pueden conducir a la formación de un sabor desagradable en la cerveza, tal como de ácido ferúlico libre y 4-VG.

20 Métodos:

25 Basándose en los criterios mencionados en las tablas 8 + 9, se encontraron más de 15 xilanasas de DuPont Industrial Biosciences como posibles candidatos. Las xilanasas se seleccionaron en la aplicación de macerado de laboratorio aplicando hasta un 30% de cebada en combinación con malta. Entre otros, se controlaron la velocidad de separación de la pasta, el nivel de pentosano/arabinoxilano y las viscosidades del mosto. Los mejores candidatos fueron probados en varios estudios piloto de plantas de cervecería para probar la hipótesis de los inventores y vincular las características de la xilanasas a la funcionalidad en la elaboración de la cerveza. La dosificación óptima del candidato de xilanasas seleccionado se ensayó en combinación con una β-glucanasa.

Resultados y discusión:

Tabla 10: Muestra ID	Control	Ref (x+B).	X1	X2	X3
Viscosidad Din. (12 °Plato) mPa.s	1,798	1,670	1,801	1,746	1,794
Extracto (°Plato)	15,1	15,7	15,6	15,2	15,1
Total pentosano (mg/l)	1610	1910	2440	2020	1710

La planta piloto produce cerveza donde la dosis enzimática es la única variable. La aplicación de una xilanasa WU-AX selectiva (X1) da como resultado el colapso del lecho de filtro. Los candidatos de xilanasa selectiva WE-AX (referencia, X2, X3) dan como resultado una acumulación de presión baja. La referencia es una mezcla de xilanasa + beta-glucanasa.

5

Tabla 11: Análisis de mosto - estudios de plantas piloto

ID de muestra	Ref.	X + B	Xh + B
Extracto (°Plato)	15,70	16,00	15,95
Betaglucano en mosto (mg/l)	44	35	25
Viscosidad Din. a 12 ° Plato (mPa.s)	1,65	1,68	1,68
Total pentosano (mg/l)	3540	2970	3010

Tabla 12: Análisis aldehydico de Strecker de cerveza envejecida

Marcadores de envejecimiento (cerveza forzada a envejecer)	Unidad	Ref.	X+B	Xh+B
2-Me-Pr	ppb	25	24	22
2-Me-Bu	ppb	3	2	3
3-Me-Bu	ppb	9	7	8
Furfural	ppb	113	85	93
Metional	ppb	6	5	6
PheAcal	ppb	10	9	10
T2N	ppb	0,022	0,022	0,022

Mezclas optimizadas de una xilanasa selectiva de WE-AX aplicada en una dosificación media (X) y alta (Xh) en combinación con  $\beta$ -glucanasa (B) sobre 20% de cebada/80% de malta. Los resultados indican un buen rendimiento de separación de la pasta y la cerveza con un bajo riesgo de formación de sabor desagradable y colapso del lecho de filtro.

10

Conclusión

El estudio ha demostrado la importancia de la aplicación de xilanasas para la elaboración de la cerveza que son altamente selectivas para el WE-AX durante la trituración. Se obtienen los siguientes beneficios:

15

- Buena separación de la pasta y rendimiento de filtración de cerveza
- Riesgo minimizado del colapso del lecho filtrante en el aclarado
- Reducción del potencial de formación de sabor distinto del sabor relacionado con la degradación del arabinoxilano
- Tolerancia a la sobredosificación de xilanasa

Las xilanasas se pueden aplicar a menudo con un alto efecto beneficioso en combinación con las beta-glucanasas para el control de la separación.

20

Ejemplo 3

Evaluación de las combinaciones X3/BglS (también denominadas AtuXyn3/BsuGluS) en 2 ensayos de producción de cerveza piloto 2 HL

Materiales y métodos:

Experimentos: Enzimas:

AtuXyn3 (X3)/BsuGluS (Bgls) (a): Combinación de BgIS (Bacillus glucanasa) y X3 (Aspergillus xilanasa, BgLS: 0,50 mg de proteína/kg de grano y X3:1,50 mg de proteína/kg de grano).

- 5 AtuXyn3 (X3)/BsuGluS (Bgls) (b): Como AtuXyn3 (X3)/BsuGluS (Bgls) (a), pero con un 20% de aumento de la dosis de X3 para probar la robustez.

Referencia: Producto enzimático de referencia (Ultraflo® Max) dosificado a 0,20 kg/T de grano.

Materia prima:

Material adyuvante: cebada 22% p/p.

- 10 Malta: malta de Pilsner Chiraz 42,6% p/p, malta Pilsner Quench DMG 35,4% peso pr. peso (ww).

Todo el material utilizado para el ajuste ácido de los niveles de pH, Calcio, Cinc y amargor son de grado alimenticio y considerados como materiales de preparación estándar.

La receta para la producción de cerveza se dirigía a un estilo de cerveza como cerveza rubia internacional.

Molido:

- 15 Molino piloto de rodillos Kunzel 2. El material molido pasaba por los rodillos dos veces simulando un molino de 4 rodillos.

Grano de malta: el molino funcionaba a 1,5 mm en la primera pasada y 0,7 mm en la segunda pasada de los rodillos.

Grano de cebada: el molino funcionaba a 1,5 mm en la primera pasada y 0,4 mm en la segunda pasada de los rodillos.

- 20 Sala de cocción 2 HL:

Todas las producciones de cerveza se basaron en la producción de cerveza HGB (elaboración de cerveza de alta densidad) y en el aclarado estándar de 190 l de mosto con el objetivo de 16 °Plato. Durante el aclarado que se realizó a flujo fijo, se registró la presión diferencial (utilizada como parámetro para evaluar el rendimiento del aclarado). Todos los materiales de la preparación de la cerveza se molieron antes de tiempo (24 h) y se mantuvieron en cubos cerrados antes del contacto con el agua. Todo el material se descargó en el hervidor de la pasta en los primeros 3 minutos después del comienzo de la trituración. El ajuste del calcio y del pH se realizó antes de la adición enzimática. El pH (20°C) se volvió a comprobar en la rotura a 52°C. La normalidad del yodo se confirmó después de 10 minutos a 72°C. El aclarado se realizó a 78°C.

- 25 El rendimiento del aclarado se evaluó a flujo fijo a 90 l/h durante la primera recolección del mosto. El flujo se incrementó a 110 l/hora y 130 l/h durante el rociado y la recogida del mosto débil. El análisis químico se realizó sobre el mosto frío.

Hervido del mosto:

La ebullición se realizó usando una caldera externa con una evaporación de 4-5%. Los extractos del lúpulo se añadieron desde el principio de la ebullición del mosto con el objetivo de 20 UB en la cerveza final.

- 35 Fermentación 50L:

Todas las fermentaciones se realizaron en tanques cilíndricos de 50 litros. La fermentación se realizó según procedimientos de operación estándar. La adición de la levadura se realizó con  $15 \times 10^6$  células de levadura vivas/ml. El recuento de levaduras y la viabilidad se calcularon utilizando un contador Nucleo.

Procesamiento de la cerveza:

- 40 Filtro de placas y marco operado a presión constante. La evaluación del flujo se realizó en peso.

Los datos se recogieron de 1 y 3 placas de filtro.

Producción de cerveza sin alcohol:

Todas las cervezas fueron elaboradas sin alcohol a 5,0% ABV (Alcohol por Volumen), considerado como estándar internacional de cerveza rubia.

- 45



Embotellado:

El CO<sub>2</sub> se ajustó a 5,0 g/l. Todas las muestras de cerveza se embotellaron en botellas estándar de 33 cl en una máquina de llenado automático McLennon utilizando una sola evacuación.

Análisis de cerveza:

5 Las cervezas recién preparadas se analizaron usando GC-MS

El perfil de envejecimiento químico se determinó usando GC-MS.

Resultados y observaciones: Machacado.

El machacado se realizó con la siguiente condición:

52°C durante 10 minutos simulando una maceración de 15-20 minutos usando un molino continuo.

10 65°C durante 40 minutos.

72°C durante 30 minutos.

78°C durante 10 minutos.

Todos los pasos de rampa se ejecutaron a 1°C. En la figura 7 se muestra una representación gráfica.

15 Todos los ensayos se realizaron con este régimen de trituración con el objetivo de preparar una producción de cerveza de Plato de 16°. No hubo comentarios a este paso del proceso.

Resultados y observaciones: Aclarado.

20 El aclarado se realizó en la cervecería 2hl con una carga de 150 kg/m<sup>2</sup>. Esto es representativo para una operación estándar de cervecería. El control del proceso de aclarado se realizó como un flujo fijo a un promedio de 100 litros/hora. El caudal inicial es de 90 litros/hora, aumentando a 130 litros/hora durante la recogida de mosto débil. Se registró la presión diferencial y la medición en línea de la turbidez para las cuatro cervezas. La recolección total del mosto y del aclarado se realizó en aproximadamente las siguientes 2 horas.

Se sugiere que los ensayos X3/BglS (b) y X3/BglS (a) son los ensayos que tuvieron el mejor rendimiento de aclarado seguido por el ensayo X3/BglS (a) y el ensayo UF máx con el peor desempeño.

Tabla 13: Datos recogidos durante el aclarado de la masa de los cuatro ensayos.

	UF max	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
Carga del túnel de aclarado (kg/m <sup>3</sup> )	153	153	153	153
Tiempo del túnel de aclarado (min)	154	164	170	154
Presión de Dif. (cm)	40	30	30	30
Decantación (nº. de cortes profundos)	1	1	1	1
Turbidez (EBC)	10	15	10	10
Elevación de la primera presión del mosto (cm/h)	40	33	31	30
Tiempo hasta el primer corte profundo (min)	45	60	120	115
"Presión Dif." y "primera acumulación de presión del mosto" en la tabla se midieron como cmWC (cm de columna de agua) y no como (cm) y (cm/h), respectivamente.				

25 Resultados y observaciones: Análisis del mosto después de la ebullición.

El análisis del mosto frío muestra resultados similares. El análisis de beta-glucano indica una ligera diferencia entre las muestras.

Tabla 14: Análisis químico del mosto frío.

Mosto	UF max	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
Extracto (% plato)	16,09	16,05	15,99	16,1
Color (EBC)	9,7	9,3	9,3	9,3

## ES 2 645 921 T3

Mosto	UF max	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
pH	5	5,2	5,2	5,2
Yodo (S/N)	N	N	N	N
Amargor (BU, EBC)	52	51	46	50

Tabla 15: Datos analíticos sobre el mosto frío.

	UF max	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
Beta-glucano en mosto (mg/L)	49	40	25	30
Viscosidad Din. a 12°C (mPa.s)	1,888	1,685	1,679	1,686
Pentosano (mg/l)	3365	2975	3014	2964
Ácido ferúlico (ug/ml)	4,3	3,9	3,8	3,9
4-VG (ug/ml)	<0,49	<0,49	<0,49	<0,49
(12°C es 12°Plato); (%Plato se puede utilizar indistintamente con °Plato)				

Resultados y observaciones: Fermentación.

El análisis de la cerveza verde se da en la tabla 16.

Tabla 16: Análisis de cerveza verde.

Cerveza verde	UF max	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
Alcohol (% vol)	6,79	6,79	6,7	6,86
Extracto real (% P)	6,28	6	6	6
RDF (%)	63,5	63,7	63,5	64,4
Extracto original (% P)	16,29	16,25	16,09	16,24
Color (EBC)	8,3	8,5	-	-
pH	4,4	4,4	4,4	4,4
SO2 (ppm)	7	9	11	10
Amargor (BU, EBC)	29	28	27	27

- 5 El análisis de cerveza verde muestra un alto grado de similitud entre los ensayos. Todos los ensayos tienen un RDF relativamente bajo, pero esto se observa normalmente con la inclusión de 22% de cebada calculada sobre la base del peso por peso (p/p).

Resultados y observaciones: Filtración de cerveza.

- 10 Las muestras de cerveza se filtraron usando un filtro de placa y marco usando una presión fija. Se filtraron dos barriles de aproximadamente 15 kg y se presentan los datos individuales de filtración del barril en la tabla 17. El primer barril se filtró usando una lámina de filtro y el segundo barril se filtró usando 3 hojas de filtro. La presión diferencial fue siempre de 0,5 bar. Las placas de filtro son KD7 (20cmx20cm) de Begerow.

El cuadro general de las curvas de filtración de 1 ó 3 filtraciones de la placa de filtro es el mismo. Se piensa que el registro de 1 placa de filtro puede ser demasiado sensible para mostrar la diferencia de relación real.

- 15 Tabla 17: Datos de filtración del barril de los cuatro ensayos

Filtración	UF max	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
Velocidad de filtración - 1 hoja de filtro (L/h)	4,8	5,6	9,9	11,8
Velocidad de filtración - 3 hojas de filtro (L/h)	77,2	59,6	70,6	105,4

Resultados y observaciones: Análisis final de la cerveza.

Las cervezas de ensayo se analizaron de acuerdo con los procedimientos de operación estándar (EBC) y se presentan en la tabla 18.

Tabla 18: Análisis final de la cerveza.

Cerveza final	UF max	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
Alcohol (%)	4,82	4,89	5,01	4,92
Extracto real (% P)	4,5	4,6	4,6	4,4
RDF (%)	63,2	63,4	63,8	64,3
Extracto original (% P)	11,85	11,99	12,19	11,89
Color (EBC)	4,8	4,9	5	5
pH	4,4	4,4	4,4	4,4
SO2 (ppm)	13	13	10	6
Amargor (BU, EBC)	22	22	20	18
Turbidez (EBC)	0,43	0,4	0,38	0,4
Turbidez total - 5d-60 dg C (EBC)	8,6	12,9	7,3	6,2
CO2 (g/L)	4,9	5,3	5,1	5,2
Diacetilo (ppb)	12	11	8	10
Retención de cabeza (S)	107	111	119	108
Volumen de espuma (ml)	452	476	460	470

5 Resultados y observaciones: Aldehídos de Strecker y "marcadores de envejecimiento" en la cerveza final.

El análisis se realizó tanto en la cerveza recién preparada como en la vieja. Aldehídos de Strecker y "marcadores de envejecimiento y calor" (2-Me-Pr (2-metilpropanal), 2-Me-Bu (2-metilbutanal), 3-Me-Bu (3-metilbutanal), Furfural, Metional, PheAcal (fenil acetaldehído) y T2N (trans-2-nonenal)) se analizaron por GC-MS tanto en la cerveza recién preparada y en la envejecida. Los datos del análisis de la cerveza recién preparada se presentan en la tabla 19.

10 Tabla 19: Análisis del aldehído de Strecker de la cerveza recién preparada. Se utilizan marcadores para el calor y el envejecimiento (Furfural y trans-2-Nonenal) como control de la muestra.

Marcadores de envejecimiento (cerveza recién preparada)	UF max	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
2-ME-Pr (ppb)	5	5	5	6
2-ME-Bu (ppb)	2	2	2	2
3-ME-Bu (ppb)	6	6	6	6
Furfural (ppb)	10	11	11	10
Metional (ppb)	4	4	4	4
PheAcal (ppb)	6	6	6	7
T2N (ppb)	0,0011	0,005	0,004	0,006

Las cervezas de ensayo se incubaron a 37°C durante 2 semanas antes del análisis de aldehído de Strecker. Los datos para las muestras de cerveza envejecida se presentan en la tabla 20.

15 Tabla 20: Análisis de aldehído de Strecker de cerveza envejecida. Se utilizan marcadores para el calor y el envejecimiento (furfural y trans-2-Nonenal) como control de muestra.

Marcadores de envejecimiento (cerveza envejecida forzada)	UF max	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
2-ME-Pr (ppb)	25	23	22	26

Marcadores de envejecimiento (cerveza envejecida forzada)	UF max	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
2-ME-Bu (ppb)	3	3	3	2
3-ME-Bu (ppb)	9	7	7	8
Furfural (ppb)	111	92	93	78
Metional (ppb)	6	5	6	6
PheAcal (ppb)	10	9	9	10
T2N (ppb)	0,017	0,022	0,022	0,022

Los datos presentados en la tabla 20 muestran un aumento esperado en el nivel de aldehído de Strecker. El aumento de furfural y trans-2-Nonenal alcanzan un nivel esperado.

Conclusión:

5 Con base en los experimentos a escala piloto, se puede concluir que las proporciones de BglS y X3 probadas en este Experimento son tan buenas o incluso mejores que la referencia UltraFlo Max en la elaboración de cerveza a escala piloto.

10 Los resultados son sorprendentes, visto a la luz la materia prima exigente utilizada, 22% de inclusión de cebada en combinación con la malta que contiene  $\beta$ -glucano 300 mg/l. El rendimiento no sólo se ve en los resultados de separación de la pasta, sino también en la filtración de la cerveza. Debido a la baja solubilización del material de la pared celular cuando se utiliza el BREW2 (datos de pentosano), puede registrarse un grado menor de material de pared celular que pueda causar problemas de calidad en relación con el sabor y la estabilidad.

Finalmente, se puede concluir que un aumento del 20% en la dosis del componente de xilanas en X3/BglS (b) parece no tener ningún impacto en ninguno de los parámetros evaluados, indicando que X3/BglS (a) es una combinación robusta de enzimas.

15 Secuencias:

AtuXyn3, *Aspergillus tubingensis* (SEQ ID NO:1), 302 aa

QASVSIDTKFKAHGKKYLGNIQDQYTLTKNSKTPAIKADFGALTPENSMKWDATEPSRGQFSFSGSDYL  
VNFAQSNKLRGHTLVWHSQLPVWVQAITDKNTLIEVMKNHITVVMQHYKGIYAWDVVNEIFNEDGS  
LRDSVYQVIGEDYVRIAFETARAADPNKLYINDYNLDSASYPKLTGMVSHVKKWIEAGIPIDGIGSQTH  
LSAGGGAGISGALNALAGAGTKEIAVTELDIAGASSTDYVEVVEACLDQPKCIGITVWGVADPDSWRSSS  
TPLLFDNSYNPKPAYTAIANAL

TerXyn1, *Geosmithia emersonii* (*Taleromyces emersonii*) (SEQ ID NO:2)

AGLNTAAKAIGLKYFGTATDNPESDTAYETQLNNTQDFGQLTPANSMKWDATEPEQNVFTFSAGDQIAN  
LAKANGQMLRCHNLVWYNQLPSWVTSVSGWTNETLLAAMKNHITNVVTHYKGCYAWDVVNEALNDDG  
TYRSNVFYQYIGEAYIPIAFATAAAAADPNKLYINDYNIIEYPGAKATAAQNLVQSYGARIDGVGLQSH  
FIVGETPSTSSQQNMAAFTALGVEVAITELDIRMQLPETEALLTQQATDYQSTVQACANTKGCVGITVW  
DWDKYSWVPSVTSFGYGDACPWDANYQKKPAYEGILTGLGQTVTSTTYIISPTTSVGTGTTTSSGGSGG  
TTGVAQHWEQCGGLGWTGPTVCASGYTCTVINEYYSQCL

AtuXyn4, *Aspergillus tubingensis* (SEQ ID NO:3)

ES 2 645 921 T3

EPIEPRQASVSI DTKFKAHGKKYLGNIGDQYTLTKNSKTPAIIKADFGALTPENSMKWDATEPSRGQFSFS  
GSDYLVNFAQSNNKLI RGH TLVWHSQ LPSWVQSI TDKNTLIEVMKNHI TTVMQHYKGKI YAWDVVNEIF  
NEDGSLRDSV FYKVI GEDYVRI AFETARAADPNAKLYI NDYNLDSASYPKLTGMVSHVKKWIAAGI PIDGI  
GSQTHLSAGGGAGI SGALNALAGAGTKEIAVTELDIAGASSTDYVEVVEACL NQPKCIGITVWGVADPDS  
WRSSSTPLL FDSNYPKPAYTAI ANAL

AacXyn2, *Aspergillus aculeatus* (SEQ ID NO:4)

MVGLLSI TAALAA TVLPNI VSAVGLDQA AVAKGLQYFGTATDNPELTDIPYVTQLNNTADFGQITPGNSMK  
WDATEPSQGTFTFTKGDVIADLAEGNGQYL RCH TLVWYNQLPSWVTS GTWTNATLTAALKNHI TNV VSH  
YK GKCLHWDVVNEALNDDGTYRTNI FYTTI GEAYIPIAFAAAAAADPDAKLFYNDYNLEYGGAKAASARAI  
VQLVKNAGAKI DGVGLQA HFSVGTVPSTSSLVSVLQSFTALGVEVAYTEADVRI LLPTTATTLAQSSDFQ  
ALVQSCVQTTGCVGFTIWDWTDKYSWVPSTFSGYGAALPW DENLVKKPAYNGLLAGMGVTVTTTTTTTT  
ATATGKTTTTT GATSTGTAAHWGQCGGLNWSGPTACATGYTCTYVNDYYSQCL

TreXyn3, *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO:5)

MKANVILCLLAPLVAALPTETIHLDPELAALRANL TERTADLWDRQASQSIDQLIKRKGKLYFGTATDRGLL  
QREKNAAI IQADLGQVTPENSMKWQ SLENNQGQLN WGDADYLVNFAQQNGKSIRGH TLIWHSQ LPAW  
VNNINNADTLRQVIRTHVSTVVG RYK GKIRAWDVVNEIFNEDGTLRSSVFSRLLGEEFVSIAFRAARDADP  
SARLYINDYNLDRANYGKVNGLKTYVSKWISQGVPIDGIGSQSHLSGGGGSGTLGALQQLATVPVTE LAI  
TELDIQGAPTTDYTQVVQACLSVSKCVGITVWGISDKDSWRASTNPLLFDANFNPKPAYNSIVGILQ

TreXyn5, *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO:6)

QCIQP GTGYNNGYFYSYWN DGHGGV TYCNGPGGQFSVNWSNSGNFVGGKGWQPGTKNRVIN FSGSY  
NPNGNSYLSVYGW SRNPLIEYYI VENFGTYNPSTGATKLGEVTS DGSVYDI YRTQRVNQPSII GTATFYQY  
WSVRRNHRSSGSVNTANHFNAWAQQGLTLGTMDYQI VAVEGYFSSGSASITVSD

BsuGluS, *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO:7), 214 aa

QTGGSFFDPFNGYNSGFWQKADGYSNGNMFNCTWRANNVSM TSLGEMRLALTSPAYNKFD CGENRSV  
QTYGYGLYEV RMKPAKNTGIVSSFFTYTGPTDGTPWDEIDIEFLGKDTTKVQFNYYTNGAGNHEKIVDLGF

DAANAYHTYAFDWQPNSIKWYVDGQLKHTATNQIPTTPGKIMMNLWNGTGVD EWLGSYNGVNPLYAHY  
DWVRYTKK

TerGlu1, *Geosmithia emersonii* (*Taleromyces emersonii*) (SEQ ID NO:8)

ES 2 645 921 T3

APVKEKGIKKRASPFQWFGSNESGAIEFGNNIPGVEGTDYTFPNTSAIQILIDQGMNIFRVPFLMERMVP  
NQMTGPVDSAYFQGYSSQVINYITSHGASAVIDPHNFGRYNNIISSPSDFQTFWHTIASNFADNDNVIFD  
TNNEYHDMDESLLVQLNQAADGIRAAGATSQYIFVEGNSWTGAWTWTQVNDAMANLTDPOKIVYEM  
HQYLDSDGSGTSDQCVNSTIGQDRVESATAWLKQNGKKAILGEYAGGANSVCETAVTGMLDYLANNTD  
VWTGAIWWAAGPWWGDYIFSMPPSGIAYEQVLPPLQPYL

BsuGlu103FULL, *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO:9)

DDYSVVEEHGQLSISNGELVNERGEQVQLKGMSSHGLQWYGQFVNYESMKWLRDDWGITVFRAAMYT  
SSGGYIDDPSVKEKVKETVEAAIDLGIYVIDWHILSDNDPNYKKEAKDFFDEMSELYGDYPNVIYEIANE  
PNGSDVTWDNQIKPYAEVIVIRDNDPNIVIVGTGTWSQDVHHAADNQLADPNVMYAFHFYAGTHG  
QNLRDQVDYALDQGAIFVSEWGTSAATGDGGVFLDEAQVWIDFMDERNLSWANWSLTHKDESSAAL  
MPGANPTGGWTEAELSPSGTFVREKIREASIPPSDPTPPSDPGEPDPGEPDPTPPSDPGEYPAWDSNQI  
YTNEIVYHNGQLWQAKWWTQNPQEPGDPYGPWEPLKSDPDSGEPDPTPPSDPGEYPAWDSNQIYTNEIV  
YHNGQLWQAKWWTQNPQEPGDPYGPWEPLN

TreGlu2, *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO:10)

QQTVWQCGGIGWSGPTNCAPGSACSTLNPYYAQCPGATTITSTRPPSGPTTTTTRATSTSSSTPPTSS  
GVRFAGVNIAGDFGCTTDGTCVTSKVYPLKNFTGSNNYPDGIGQMQLHFVNDDGMTIFRLPVGWQYLV  
NNNLGGNLDSTSISKYDQLVQGCLSLGAYCIVDIHNYARWNGGIIQGGPTNAQFTSLWSQLASKYASQ  
SRVWFGIMNEPHDVNINTWAATVQEVVTAIRNAGATSQFISLPGNDWQSAGAFISDGSAAALSQVTNPD  
GSTNLIFDVHXYLSDNSGTHAECTTNNIDGAFSPLATWLRQNNRQAILTETGGGNVQSCIQDMCQQI  
QYLNQNSDVYLYGVGWGAGSFDSTYVLTETPTGSGNSWTDTSLVSSCLARK

TreGlu3, *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO:11)

QTSCDQWATFTGNGYTVSNNLWGASAGSGFGCVTAVSLSGGASWHADWQWSSGGQNNVKSQNSQI  
AIPQKRTVNSISSMPTTASWSYSGSNIRANVAYDLFTAANPNHVTYSGDYELMIWLGKYGDIGPIGSSQG  
TVNVGGQSWTLYGYNGAMQVYSFVAQTNTTNYSGDVKNFFNYLRDNKGYNAAGQYVLSYQFGTEPFT  
GSGTLNVAWASIN

TreGlu4, *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO:12)

HGHINDIVINGVWYQAYDPTTFPYESNPPIVVGWTAADLDNGFVSPDAYQNPDIICHKNATNAKGHASVK  
AGDTILFQWVPVWPHPGPIVDYLANCNGDCETVDKTTLEFFKIDGVGLSSGGDPGTWASDVLISNNNT  
WVVKIPDNLAPGNYVLRHEIALHSAGQANGAQNYPQCFNIAVSGSGSLQPSGVLTDLYHATDPGVLIN  
IYTSPLNYIIPGPTVVSGLPTSVAQGSSAATATASATVPGGGSGPTSRTTTTARTTQASSRPSSTPPATSA  
PAGGPTQTLYGQCGGSGYSGPTRCAPPATCSTNPYYAQLN

TreGlu6, *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO:13)

AFSWKNVKLGGGGFVPGIIFHPKTKGVAYARTDIGGLYRLNADDSWTAVTDGIADNAGWHNWGIDAV  
ALDPQDDQKVYAAVGMYSWDPNSGAIIRSSDRGATWSFTNLPFKVGGNMPGRGAGERLAVDPANSN  
IIYFGARSGNLWKSTDGGVTFKSVSSFTATGTYPDPSPDSNGYNSDKQGLMWVTFDSTSSTTGGATSR  
IFVGTADNITASVYVSTNAGSTWSAVPGQPGKYFPHKAKLQPAEKALYLTYSWWPDAQLFRSTDSGTTW  
SPIWAWASYPTETYYSISTPKAPWIKNNFIDVTSESPSDGLIKRLGWMIESLEIDPTDSNHWLYGTGMTI  
FGGHDLTNWDTRHNVSIQSLADGIEEFSVQDLASAPGGSELLAAVGDDNGFTFASRNDLGTSPQTVWAT  
PTWATSTSVYDAGNSVKSVVRVGN TAGTQQVAISSDGGATWSIDYAADTSMNGGTVAYSADGDTILWS  
TASSGVQRSQFQGSFASVSSLPAGAVIASDKKTNVSVFYAGSGSTFYVSKDTGSSFRGPKLGSAGTIRDI  
AAHPTTAGTLYVSTDVGIFRSTDSGTTFGQVSTALTNTYQIALGVGSGSNWNLYAFGTGPSGARLYASGD  
SGASWTDIQGSQGFSGSIDSTKVAGSGSTAGQVYVGTNGRGVFYAQGTVGGGTGGTSSSTKQSSSSTS  
SASSSTTLRSSVSTTRASTVTSSRTSSAAGPTGSGVAGHYAQCGGIGWTGPTQCVAPYVCQKQNDYYY  
QCV

TreGlu7, *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO:14)

HGQVQNFTINGQYNQGFILDYYYQKQNTGHFPNVAGWYAEDLDLGFISPDQYTTTPDIVCHKNAAPGAISA  
TAAAGSNIVFQWGPVWPHYPYGPVITYVVECSGSCCTTVNKNLNRWVKIQEAGINYNTQVWAQQDLINQ  
GNKWTVKIPSSLRPGNYVFRHELLAAHGASSANGMQNYPQCVNIAVTGSGTKALPAGTPATQLYKPTDP  
GILFNPYTTITSYTIPGPALWQG

TreGlu8, *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO:15)

GKIKYLGVAIPGIDFGCDIDGSCPTDTSSVPLLSYKGGDGAGQMKHFAEDDGLNVFRISATWQFVLNNTV  
DGKLELNWGSYNKVVNACLETGAYCMIDMHNFAFYNGGIIGQGGVSDDIFVDLWVQIAKYEDNDKII  
FGLMNEPHDLIDIEIWAQTCQKVVTAIRKAGATSQMILLPGTNFASVETYVSTGSAEALGKITNPDGSTDLL  
YFDVHKYLDINNSGSHAECTTDNVDAFNDFADWLRQNKRQAIISSETGASMEPSCMTAFCAQNKAISENS  
DVYIGFVGWAGSFDTSYILTLPLGKPGNYTDNKLMECILDQFTLDEKYRPTPTSISTAAEETATATATS  
DGDAPSTTKPIFREETASPTPNAVTKPSPDTSDDSSDDKDSAASMSAQGLTGTVLFTVAALGYMLVAF

BsuGluC CBD, *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO:16)

MKRSISIFITCLLITLLTMGGMIASPASAAGTKTPVAKNGQLSIKGTQLVNRDYGKAVQLKGISSHGLQWYG  
EYVNDKSLKWLRRDDWGITVFRAAMYADGGYIDNPSVKNKVKEAVEAAKELGIYVIDWHILNDGNPNQ  
NKEKAKEFFKEMSSLYGNTPNVIYEIANEPNGDVNWKRDIKPYAAEIVSVIRKNDPDNIIIVGTGTWSQDV  
NDAADDQLKDANVMYALHFYAGTHGQFLRDKANYALSKGAPIFVTEWGTSDASGNGGVFLDQSREWLVK  
YLDKSTISWVNWNLSDKQESSALKPGASKTGGWRLSDLSASGTFVRENILGTDSTKDIPETPSKDKPT  
QENGISVQYRAGDGSMSNSNQIRPQLQIKNNGNTTVDLKDV TARYWYKAKNKGQNFDCDYAQIGCGNVT  
HKFVTLHKPKQGADTYLELGFKNGLAPGASTGNIQLRLHNDWSNYAQSGDYSFFKSNTFKTTKITLY  
DQGKLIWGTEPN

BsuXyn3, Variante de xilanasa de *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO:17)

## ES 2 645 921 T3

ASTDYWQNWTFGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYL  
TLYGWTRSPLIEYYVVDSWGTYRPTGTYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDDTTFTQYWSVRQSKR  
PTGSNATITFSNHVNAWKSHGMNLSNWAYQVMATEGYQSSGSSNVTWV

BsuXyn4, Variante de xilanasa de *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO:18)

ASTDYWQNWTDGYGIVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYL  
TLYGWTRSPLIEYYVVDSWGTYRPTGTYKGTVYSDGGWYDIYTATRDNAPSIDGDFTTFTQYWSVRQSK  
RPTGSNATITFSNHVNAWRSHGMDLGSNWAYQVMATEGYLSSGSSNVTWV

### Listado de secuencias

- <110> DuPont Nutrition Biosciences ApS
- <120> Enzimas
- 5 <130> 18733PCT00
- <160> 18
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 302
- 10 <212> PRT
- <213> *Aspergillus tubigensis*
- <400> 1



ES 2 645 921 T3

Gln Ala Ser Val Ser Ile Asp Thr Lys Phe Lys Ala His Gly Lys Lys  
 1 5 10 15

Tyr Leu Gly Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Thr Leu Thr Lys Asn Ser Lys  
 20 25 30

Thr Pro Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Leu Thr Pro Glu Asn  
 35 40 45

Ser Met Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Arg Gly Gln Phe Ser Phe  
 50 55 60

Ser Gly Ser Asp Tyr Leu Val Asn Phe Ala Gln Ser Asn Asn Lys Leu  
 65 70 75 80

Ile Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Ser Gln Leu Pro Ser Trp Val  
 85 90 95

Gln Ala Ile Thr Asp Lys Asn Thr Leu Ile Glu Val Met Lys Asn His  
 100 105 110

Ile Thr Thr Val Met Gln His Tyr Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp  
 115 120 125

Val Val Asn Glu Ile Phe Asn Glu Asp Gly Ser Leu Arg Asp Ser Val  
 130 135 140

Phe Tyr Gln Val Ile Gly Glu Asp Tyr Val Arg Ile Ala Phe Glu Thr  
 145 150 155 160

Ala Arg Ala Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Asn  
 165 170 175

ES 2 645 921 T3

Leu Asp Ser Ala Ser Tyr Pro Lys Leu Thr Gly Met Val Ser His Val  
 180 185 190

Lys Lys Trp Ile Glu Ala Gly Ile Pro Ile Asp Gly Ile Gly Ser Gln  
 195 200 205

Thr His Leu Ser Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ile Ser Gly Ala Leu Asn  
 210 215 220

Ala Leu Ala Gly Ala Gly Thr Lys Glu Ile Ala Val Thr Glu Leu Asp  
 225 230 235 240

Ile Ala Gly Ala Ser Ser Thr Asp Tyr Val Glu Val Val Glu Ala Cys  
 245 250 255

Leu Asp Gln Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val Ala Asp  
 260 265 270

Pro Asp Ser Trp Arg Ser Ser Ser Thr Pro Leu Leu Phe Asp Ser Asn  
 275 280 285

Tyr Asn Pro Lys Pro Ala Tyr Thr Ala Ile Ala Asn Ala Leu  
 290 295 300

<210> 2

<211> 386

<212> PRT

5 <213> *Geosmithia emersonii*

<400> 2

Ala Gly Leu Asn Thr Ala Ala Lys Ala Ile Gly Leu Lys Tyr Phe Gly  
 1 5 10 15

Thr Ala Thr Asp Asn Pro Glu Leu Ser Asp Thr Ala Tyr Glu Thr Gln  
 20 25 30

Leu Asn Asn Thr Gln Asp Phe Gly Gln Leu Thr Pro Ala Asn Ser Met  
 35 40 45

Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Glu Gln Asn Val Phe Thr Phe Ser Ala  
 50 55 60

Gly Asp Gln Ile Ala Asn Leu Ala Lys Ala Asn Gly Gln Met Leu Arg  
 65 70 75 80

Cys His Asn Leu Val Trp Tyr Asn Gln Leu Pro Ser Trp Val Thr Ser  
 85 90 95

ES 2 645 921 T3

Gly Ser Trp Thr Asn Glu Thr Leu Leu Ala Ala Met Lys Asn His Ile  
100 105 110

Thr Asn Val Val Thr His Tyr Lys Gly Gln Cys Tyr Ala Trp Asp Val  
115 120 125

Val Asn Glu Ala Leu Asn Asp Asp Gly Thr Tyr Arg Ser Asn Val Phe  
130 135 140

Tyr Gln Tyr Ile Gly Glu Ala Tyr Ile Pro Ile Ala Phe Ala Thr Ala  
145 150 155 160

Ala Ala Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Tyr Asn Asp Tyr Asn Ile  
165 170 175

Glu Tyr Pro Gly Ala Lys Ala Thr Ala Ala Gln Asn Leu Val Lys Leu  
180 185 190

Val Gln Ser Tyr Gly Ala Arg Ile Asp Gly Val Gly Leu Gln Ser His  
195 200 205

Phe Ile Val Gly Glu Thr Pro Ser Thr Ser Ser Gln Gln Gln Asn Met  
210 215 220

Ala Ala Phe Thr Ala Leu Gly Val Glu Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp  
225 230 235 240

Ile Arg Met Gln Leu Pro Glu Thr Glu Ala Leu Leu Thr Gln Gln Ala  
245 250 255

Thr Asp Tyr Gln Ser Thr Val Gln Ala Cys Ala Asn Thr Lys Gly Cys  
260 265 270

Val Gly Ile Thr Val Trp Asp Trp Thr Asp Lys Tyr Ser Trp Val Pro  
275 280 285

Ser Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Asp Ala Cys Pro Trp Asp Ala Asn Tyr  
290 295 300

Gln Lys Lys Pro Ala Tyr Glu Gly Ile Leu Thr Gly Leu Gly Gln Thr  
305 310 315 320

Val Thr Ser Thr Thr Tyr Ile Ile Ser Pro Thr Thr Ser Val Gly Thr  
325 330 335

Gly Thr Thr Thr Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Thr Thr Gly Val Ala  
340 345 350

ES 2 645 921 T3

Gln His Trp Glu Gln Cys Gly Gly Leu Gly Trp Thr Gly Pro Thr Val  
 355 360 365

Cys Ala Ser Gly Tyr Thr Cys Thr Val Ile Asn Glu Tyr Tyr Ser Gln  
 370 375 380

Cys Leu  
 385

<210> 3  
 <211> 308  
 <212> PRT

5 <213> *Aspergillus tubigenis*

<400> 3

Glu Pro Ile Glu Pro Arg Gln Ala Ser Val Ser Ile Asp Thr Lys Phe  
 1 5 10 15

Lys Ala His Gly Lys Lys Tyr Leu Gly Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Thr  
 20 25 30

Leu Thr Lys Asn Ser Lys Thr Pro Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly  
 35 40 45

Ala Leu Thr Pro Glu Asn Ser Met Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser  
 50 55 60

Arg Gly Gln Phe Ser Phe Ser Gly Ser Asp Tyr Leu Val Asn Phe Ala  
 65 70 75 80

Gln Ser Asn Asn Lys Leu Ile Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Ser  
 85 90 95

Gln Leu Pro Ser Trp Val Gln Ser Ile Thr Asp Lys Asn Thr Leu Ile  
 100 105 110

Glu Val Met Lys Asn His Ile Thr Thr Val Met Gln His Tyr Lys Gly  
 115 120 125

Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val Val Asn Glu Ile Phe Asn Glu Asp Gly  
 130 135 140

Ser Leu Arg Asp Ser Val Phe Tyr Lys Val Ile Gly Glu Asp Tyr Val  
 145 150 155 160

Arg Ile Ala Phe Glu Thr Ala Arg Ala Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu  
 165 170 175

ES 2 645 921 T3

Tyr Ile Asn Asp Tyr Asn Leu Asp Ser Ala Ser Tyr Pro Lys Leu Thr  
 180 185 190

Gly Met Val Ser His Val Lys Lys Trp Ile Ala Ala Gly Ile Pro Ile  
 195 200 205

Asp Gly Ile Gly Ser Gln Thr His Leu Ser Ala Gly Gly Gly Ala Gly  
 210 215 220

Ile Ser Gly Ala Leu Asn Ala Leu Ala Gly Ala Gly Thr Lys Glu Ile  
 225 230 235 240

Ala Val Thr Glu Leu Asp Ile Ala Gly Ala Ser Ser Thr Asp Tyr Val  
 245 250 255

Glu Val Val Glu Ala Cys Leu Asn Gln Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr  
 260 265 270

Val Trp Gly Val Ala Asp Pro Asp Ser Trp Arg Ser Ser Ser Thr Pro  
 275 280 285

Leu Leu Phe Asp Ser Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala Tyr Thr Ala Ile  
 290 295 300

Ala Asn Ala Leu  
 305

<210> 4

<211> 406

<212> PRT

5 <213> Aspergillus aculeatus

<400> 4

Met Val Gly Leu Leu Ser Ile Thr Ala Ala Leu Ala Ala Thr Val Leu  
 1 5 10 15

Pro Asn Ile Val Ser Ala Val Gly Leu Asp Gln Ala Ala Val Ala Lys  
 20 25 30

Gly Leu Gln Tyr Phe Gly Thr Ala Thr Asp Asn Pro Glu Leu Thr Asp  
 35 40 45

Ile Pro Tyr Val Thr Gln Leu Asn Asn Thr Ala Asp Phe Gly Gln Ile  
 50 55 60

Thr Pro Gly Asn Ser Met Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Gln Gly  
 65 70 75 80

ES 2 645 921 T3

Thr Phe Thr Phe Thr Lys Gly Asp Val Ile Ala Asp Leu Ala Glu Gly  
 85 90 95  
 Asn Gly Gln Tyr Leu Arg Cys His Thr Leu Val Trp Tyr Asn Gln Leu  
 100 105 110  
 Pro Ser Trp Val Thr Ser Gly Thr Trp Thr Asn Ala Thr Leu Thr Ala  
 115 120 125  
 Ala Leu Lys Asn His Ile Thr Asn Val Val Ser His Tyr Lys Gly Lys  
 130 135 140  
 Cys Leu His Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Leu Asn Asp Asp Gly Thr  
 145 150 155 160  
 Tyr Arg Thr Asn Ile Phe Tyr Thr Thr Ile Gly Glu Ala Tyr Ile Pro  
 165 170 175  
 Ile Ala Phe Ala Ala Ala Ala Ala Ala Asp Pro Asp Ala Lys Leu Phe  
 180 185 190  
 Tyr Asn Asp Tyr Asn Leu Glu Tyr Gly Gly Ala Lys Ala Ala Ser Ala  
 195 200 205  
 Arg Ala Ile Val Gln Leu Val Lys Asn Ala Gly Ala Lys Ile Asp Gly  
 210 215 220  
 Val Gly Leu Gln Ala His Phe Ser Val Gly Thr Val Pro Ser Thr Ser  
 225 230 235 240  
 Ser Leu Val Ser Val Leu Gln Ser Phe Thr Ala Leu Gly Val Glu Val  
 245 250 255  
 Ala Tyr Thr Glu Ala Asp Val Arg Ile Leu Leu Pro Thr Thr Ala Thr  
 260 265 270  
 Thr Leu Ala Gln Gln Ser Ser Asp Phe Gln Ala Leu Val Gln Ser Cys  
 275 280 285  
 Val Gln Thr Thr Gly Cys Val Gly Phe Thr Ile Trp Asp Trp Thr Asp  
 290 295 300  
 Lys Tyr Ser Trp Val Pro Ser Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Ala Ala Leu  
 305 310 315 320  
 Pro Trp Asp Glu Asn Leu Val Lys Lys Pro Ala Tyr Asn Gly Leu Leu  
 325 330 335

ES 2 645 921 T3

Ala Gly Met Gly Val Thr Val Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala  
 340 345 350

Thr Ala Thr Gly Lys Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Gly Ala Thr Ser Thr  
 355 360 365

Gly Thr Thr Ala Ala His Trp Gly Gln Cys Gly Gly Leu Asn Trp Ser  
 370 375 380

Gly Pro Thr Ala Cys Ala Thr Gly Tyr Thr Cys Thr Tyr Val Asn Asp  
 385 390 395 400

Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu  
 405

<210> 5

<211> 347

<212> PRT

5 <213> Trichoderma reesei

<400> 5

Met Lys Ala Asn Val Ile Leu Cys Leu Leu Ala Pro Leu Val Ala Ala  
 1 5 10 15

Leu Pro Thr Glu Thr Ile His Leu Asp Pro Glu Leu Ala Ala Leu Arg  
 20 25 30

Ala Asn Leu Thr Glu Arg Thr Ala Asp Leu Trp Asp Arg Gln Ala Ser  
 35 40 45

Gln Ser Ile Asp Gln Leu Ile Lys Arg Lys Gly Lys Leu Tyr Phe Gly  
 50 55 60

Thr Ala Thr Asp Arg Gly Leu Leu Gln Arg Glu Lys Asn Ala Ala Ile  
 65 70 75 80

Ile Gln Ala Asp Leu Gly Gln Val Thr Pro Glu Asn Ser Met Lys Trp  
 85 90 95

Gln Ser Leu Glu Asn Asn Gln Gly Gln Leu Asn Trp Gly Asp Ala Asp  
 100 105 110

Tyr Leu Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Lys Ser Ile Arg Gly His  
 115 120 125

Thr Leu Ile Trp His Ser Gln Leu Pro Ala Trp Val Asn Asn Ile Asn  
 130 135 140

ES 2 645 921 T3

Asn Ala Asp Thr Leu Arg Gln Val Ile Arg Thr His Val Ser Thr Val  
 145 150 155 160

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

Ile Phe Asn Glu Asp Gly Thr Leu Arg Ser Ser Val Phe Ser Arg Leu  
 180 185 190

Leu Gly Glu Glu Phe Val Ser Ile Ala Phe Arg Ala Ala Arg Asp Ala  
 195 200 205

Asp Pro Ser Ala Arg Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Asn Leu Asp Arg Ala  
 210 215 220

Asn Tyr Gly Lys Val Asn Gly Leu Lys Thr Tyr Val Ser Lys Trp Ile  
 225 230 235 240

Ser Gln Gly Val Pro Ile Asp Gly Ile Gly Ser Gln Ser His Leu Ser  
 245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Thr Leu Gly Ala Leu Gln Gln Leu Ala Thr  
 260 265 270

Val Pro Val Thr Glu Leu Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Gln Gly Ala  
 275 280 285

Pro Thr Thr Asp Tyr Thr Gln Val Val Gln Ala Cys Leu Ser Val Ser  
 290 295 300

Lys Cys Val Gly Ile Thr Val Trp Gly Ile Ser Asp Lys Asp Ser Trp  
 305 310 315 320

Arg Ala Ser Thr Asn Pro Leu Leu Phe Asp Ala Asn Phe Asn Pro Lys  
 325 330 335

Pro Ala Tyr Asn Ser Ile Val Gly Ile Leu Gln  
 340 345

<210> 6

<211> 191

<212> PRT

5 <213> Trichoderma reesei

<400> 6

Gln Cys Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr Asn Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser  
 1 5 10 15



ES 2 645 921 T3

Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Tyr Cys Asn Gly Pro Gly  
 20 25 30

Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp Ser Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly  
 35 40 45

Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Arg Val Ile Asn Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Val Tyr Gly Trp Ser  
 65 70 75 80

Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr  
 85 90 95

Asn Pro Ser Thr Gly Ala Thr Lys Leu Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly  
 100 105 110

Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Arg Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile  
 115 120 125

Ile Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn His  
 130 135 140

Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala  
 145 150 155 160

Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val  
 165 170 175

Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser Asp  
 180 185 190

- <210> 7
- <211> 214
- <212> PRT
- 5 <213> Bacillus subtilis

<400> 7

Gln Thr Gly Gly Ser Phe Phe Asp Pro Phe Asn Gly Tyr Asn Ser Gly  
 1 5 10 15

Phe Trp Gln Lys Ala Asp Gly Tyr Ser Asn Gly Asn Met Phe Asn Cys  
 20 25 30

Thr Trp Arg Ala Asn Asn Val Ser Met Thr Ser Leu Gly Glu Met Arg  
 35 40 45

ES 2 645 921 T3

Leu Ala Leu Thr Ser Pro Ala Tyr Asn Lys Phe Asp Cys Gly Glu Asn  
50 55 60

Arg Ser Val Gln Thr Tyr Gly Tyr Gly Leu Tyr Glu Val Arg Met Lys  
65 70 75 80

Pro Ala Lys Asn Thr Gly Ile Val Ser Ser Phe Phe Thr Tyr Thr Gly  
85 90 95

Pro Thr Asp Gly Thr Pro Trp Asp Glu Ile Asp Ile Glu Phe Leu Gly  
100 105 110

Lys Asp Thr Thr Lys Val Gln Phe Asn Tyr Tyr Thr Asn Gly Ala Gly  
115 120 125

Asn His Glu Lys Ile Val Asp Leu Gly Phe Asp Ala Ala Asn Ala Tyr  
130 135 140

His Thr Tyr Ala Phe Asp Trp Gln Pro Asn Ser Ile Lys Trp Tyr Val  
145 150 155 160

Asp Gly Gln Leu Lys His Thr Ala Thr Asn Gln Ile Pro Thr Thr Pro  
165 170 175

Gly Lys Ile Met Met Asn Leu Trp Asn Gly Thr Gly Val Asp Glu Trp  
180 185 190

Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Val Asn Pro Leu Tyr Ala His Tyr Asp Trp  
195 200 205

Val Arg Tyr Thr Lys Lys  
210

<210> 8

<211> 316

<212> PRT

5 <213> *Geosmithia emersonii*

<400> 8

Ala Pro Val Lys Glu Lys Gly Ile Lys Lys Arg Ala Ser Pro Phe Gln  
1 5 10 15

Trp Phe Gly Ser Asn Glu Ser Gly Ala Glu Phe Gly Asn Asn Asn Ile  
20 25 30

Pro Gly Val Glu Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Pro Asn Thr Ser Ala Ile  
35 40 45

ES 2 645 921 T3

Gln Ile Leu Ile Asp Gln Gly Met Asn Ile Phe Arg Val Pro Phe Leu  
50 55 60

Met Glu Arg Met Val Pro Asn Gln Met Thr Gly Pro Val Asp Ser Ala  
65 70 75 80

Tyr Phe Gln Gly Tyr Ser Gln Val Ile Asn Tyr Ile Thr Ser His Gly  
85 90 95

Ala Ser Ala Val Ile Asp Pro His Asn Phe Gly Arg Tyr Tyr Asn Asn  
100 105 110

Ile Ile Ser Ser Pro Ser Asp Phe Gln Thr Phe Trp His Thr Ile Ala  
115 120 125

Ser Asn Phe Ala Asp Asn Asp Asn Val Ile Phe Asp Thr Asn Asn Glu  
130 135 140

Tyr His Asp Met Asp Glu Ser Leu Val Val Gln Leu Asn Gln Ala Ala  
145 150 155 160

Ile Asp Gly Ile Arg Ala Ala Gly Ala Thr Ser Gln Tyr Ile Phe Val  
165 170 175

Glu Gly Asn Ser Trp Thr Gly Ala Trp Thr Trp Thr Gln Val Asn Asp  
180 185 190

Ala Met Ala Asn Leu Thr Asp Pro Gln Asn Lys Ile Val Tyr Glu Met  
195 200 205

His Gln Tyr Leu Asp Ser Asp Gly Ser Gly Thr Ser Asp Gln Cys Val  
210 215 220

Asn Ser Thr Ile Gly Gln Asp Arg Val Glu Ser Ala Thr Ala Trp Leu  
225 230 235 240

Lys Gln Asn Gly Lys Lys Ala Ile Leu Gly Glu Tyr Ala Gly Gly Ala  
245 250 255

Asn Ser Val Cys Glu Thr Ala Val Thr Gly Met Leu Asp Tyr Leu Ala  
260 265 270

Asn Asn Thr Asp Val Trp Thr Gly Ala Ile Trp Trp Ala Ala Gly Pro  
275 280 285

Trp Trp Gly Asp Tyr Ile Phe Ser Met Glu Pro Pro Ser Gly Ile Ala

ES 2 645 921 T3

290

295

300

Tyr Glu Gln Val Leu Pro Leu Leu Gln Pro Tyr Leu  
305 310 315

<210> 9  
<211> 441  
<212> PRT  
5 <213> Bacillus subtilis

<400> 9

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

Gly Glu Leu Val Asn Glu Arg Gly Glu Gln Val Gln Leu Lys Gly Met  
20 25 30

Ser Ser His Gly Leu Gln Trp Tyr Gly Gln Phe Val Asn Tyr Glu Ser  
35 40 45

Met Lys Trp Leu Arg Asp Asp Trp Gly Ile Thr Val Phe Arg Ala Ala  
50 55 60

Met Tyr Thr Ser Ser Gly Gly Tyr Ile Asp Asp Pro Ser Val Lys Glu  
65 70 75 80

Lys Val Lys Glu Thr Val Glu Ala Ala Ile Asp Leu Gly Ile Tyr Val  
85 90 95

Ile Ile Asp Trp His Ile Leu Ser Asp Asn Asp Pro Asn Ile Tyr Lys  
100 105 110

Glu Glu Ala Lys Asp Phe Phe Asp Glu Met Ser Glu Leu Tyr Gly Asp  
115 120 125

Tyr Pro Asn Val Ile Tyr Glu Ile Ala Asn Glu Pro Asn Gly Ser Asp  
130 135 140

Val Thr Trp Asp Asn Gln Ile Lys Pro Tyr Ala Glu Glu Val Ile Pro  
145 150 155 160

Val Ile Arg Asp Asn Asp Pro Asn Asn Ile Val Ile Val Gly Thr Gly  
165 170 175

Thr Trp Ser Gln Asp Val His His Ala Ala Asp Asn Gln Leu Ala Asp  
180 185 190

Pro Asn Val Met Tyr Ala Phe His Phe Tyr Ala Gly Thr His Gly Gln

ES 2 645 921 T3

195						200						205					
Asn	Leu	Arg	Asp	Gln	Val	Asp	Tyr	Ala	Leu	Asp	Gln	Gly	Ala	Ala	Ile		
210						215					220						
Phe	Val	Ser	Glu	Trp	Gly	Thr	Ser	Ala	Ala	Thr	Gly	Asp	Gly	Gly	Val		
225					230					235					240		
Phe	Leu	Asp	Glu	Ala	Gln	Val	Trp	Ile	Asp	Phe	Met	Asp	Glu	Arg	Asn		
				245					250					255			
Leu	Ser	Trp	Ala	Asn	Trp	Ser	Leu	Thr	His	Lys	Asp	Glu	Ser	Ser	Ala		
			260					265					270				
Ala	Leu	Met	Pro	Gly	Ala	Asn	Pro	Thr	Gly	Gly	Trp	Thr	Glu	Ala	Glu		
		275					280					285					
Leu	Ser	Pro	Ser	Gly	Thr	Phe	Val	Arg	Glu	Lys	Ile	Arg	Glu	Ser	Ala		
290						295					300						
Ser	Ile	Pro	Pro	Ser	Asp	Pro	Thr	Pro	Pro	Ser	Asp	Pro	Gly	Glu	Pro		
305					310					315					320		
Asp	Pro	Gly	Glu	Pro	Asp	Pro	Thr	Pro	Pro	Ser	Asp	Pro	Gly	Glu	Tyr		
				325					330					335			
Pro	Ala	Trp	Asp	Ser	Asn	Gln	Ile	Tyr	Thr	Asn	Glu	Ile	Val	Tyr	His		
			340					345					350				
Asn	Gly	Gln	Leu	Trp	Gln	Ala	Lys	Trp	Trp	Thr	Gln	Asn	Gln	Glu	Pro		
		355					360					365					
Gly	Asp	Pro	Tyr	Gly	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Lys	Ser	Asp	Pro	Asp	Ser		
370						375					380						
Gly	Glu	Pro	Asp	Pro	Thr	Pro	Pro	Ser	Asp	Pro	Gly	Glu	Tyr	Pro	Ala		
385					390				395						400		
Trp	Asp	Ser	Asn	Gln	Ile	Tyr	Thr	Asn	Glu	Ile	Val	Tyr	His	Asn	Gly		
			405						410					415			
Gln	Leu	Trp	Gln	Ala	Lys	Trp	Trp	Thr	Gln	Asn	Gln	Glu	Pro	Gly	Asp		
			420					425					430				
Pro	Tyr	Gly	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Asn									
		435					440										

<210> 10  
 <211> 397

ES 2 645 921 T3

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 10

Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Ser Gly Pro  
 1 5 10 15

Thr Asn Cys Ala Pro Gly Ser Ala Cys Ser Thr Leu Asn Pro Tyr Tyr  
 20 25 30

Ala Gln Cys Ile Pro Gly Ala Thr Thr Ile Thr Thr Ser Thr Arg Pro  
 35 40 45

Pro Ser Gly Pro Thr Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ser Thr Ser Ser Ser  
 50 55 60

Thr Pro Pro Thr Ser Ser Gly Val Arg Phe Ala Gly Val Asn Ile Ala  
 65 70 75 80

Gly Phe Asp Phe Gly Cys Thr Thr Asp Gly Thr Cys Val Thr Ser Lys  
 85 90 95

Val Tyr Pro Pro Leu Lys Asn Phe Thr Gly Ser Asn Asn Tyr Pro Asp  
 100 105 110

Gly Ile Gly Gln Met Gln His Phe Val Asn Asp Asp Gly Met Thr Ile  
 115 120 125

Phe Arg Leu Pro Val Gly Trp Gln Tyr Leu Val Asn Asn Asn Leu Gly  
 130 135 140

Gly Asn Leu Asp Ser Thr Ser Ile Ser Lys Tyr Asp Gln Leu Val Gln  
 145 150 155 160

Gly Cys Leu Ser Leu Gly Ala Tyr Cys Ile Val Asp Ile His Asn Tyr  
 165 170 175

Ala Arg Trp Asn Gly Gly Ile Ile Gly Gln Gly Gly Pro Thr Asn Ala  
 180 185 190

Gln Phe Thr Ser Leu Trp Ser Gln Leu Ala Ser Lys Tyr Ala Ser Gln  
 195 200 205

Ser Arg Val Trp Phe Gly Ile Met Asn Glu Pro His Asp Val Asn Ile  
 210 215 220

ES 2 645 921 T3

Asn Thr Trp Ala Ala Thr Val Gln Glu Val Val Thr Ala Ile Arg Asn  
225 230 235 240

Ala Gly Ala Thr Ser Gln Phe Ile Ser Leu Pro Gly Asn Asp Trp Gln  
245 250 255

Ser Ala Gly Ala Phe Ile Ser Asp Gly Ser Ala Ala Ala Leu Ser Gln  
260 265 270

Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Thr Thr Asn Leu Ile Phe Asp Val His  
275 280 285

Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His Ala Glu Cys Thr Thr  
290 295 300

Asn Asn Ile Asp Gly Ala Phe Ser Pro Leu Ala Thr Trp Leu Arg Gln  
305 310 315 320

Asn Asn Arg Gln Ala Ile Leu Thr Glu Thr Gly Gly Gly Asn Val Gln  
325 330 335

Ser Cys Ile Gln Asp Met Cys Gln Gln Ile Gln Tyr Leu Asn Gln Asn  
340 345 350

Ser Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Val Gly Trp Gly Ala Gly Ser Phe Asp  
355 360 365

Ser Thr Tyr Val Leu Thr Glu Thr Pro Thr Gly Ser Gly Asn Ser Trp  
370 375 380

Thr Asp Thr Ser Leu Val Ser Ser Cys Leu Ala Arg Lys  
385 390 395

- <210> 11
- <211> 218
- <212> PRT
- 5 <213> Trichoderma reesei

<400> 11

Gln Thr Ser Cys Asp Gln Trp Ala Thr Phe Thr Gly Asn Gly Tyr Thr  
1 5 10 15

Val Ser Asn Asn Leu Trp Gly Ala Ser Ala Gly Ser Gly Phe Gly Cys  
20 25 30

Val Thr Ala Val Ser Leu Ser Gly Gly Ala Ser Trp His Ala Asp Trp  
35 40 45

ES 2 645 921 T3

Gln Trp Ser Gly Gly Gln Asn Asn Val Lys Ser Tyr Gln Asn Ser Gln  
50 55 60

Ile Ala Ile Pro Gln Lys Arg Thr Val Asn Ser Ile Ser Ser Met Pro  
65 70 75 80

Thr Thr Ala Ser Trp Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Ile Arg Ala Asn Val  
85 90 95

Ala Tyr Asp Leu Phe Thr Ala Ala Asn Pro Asn His Val Thr Tyr Ser  
100 105 110

Gly Asp Tyr Glu Leu Met Ile Trp Leu Gly Lys Tyr Gly Asp Ile Gly  
115 120 125

Pro Ile Gly Ser Ser Gln Gly Thr Val Asn Val Gly Gly Gln Ser Trp  
130 135 140

Thr Leu Tyr Tyr Gly Tyr Asn Gly Ala Met Gln Val Tyr Ser Phe Val  
145 150 155 160

Ala Gln Thr Asn Thr Thr Asn Tyr Ser Gly Asp Val Lys Asn Phe Phe  
165 170 175

Asn Tyr Leu Arg Asp Asn Lys Gly Tyr Asn Ala Ala Gly Gln Tyr Val  
180 185 190

Leu Ser Tyr Gln Phe Gly Thr Glu Pro Phe Thr Gly Ser Gly Thr Leu  
195 200 205

Asn Val Ala Ser Trp Thr Ala Ser Ile Asn  
210 215

- <210> 12
- <211> 322
- <212> PRT
- 5 <213> Trichoderma reesei

<400> 12

His Gly His Ile Asn Asp Ile Val Ile Asn Gly Val Trp Tyr Gln Ala  
1 5 10 15

Tyr Asp Pro Thr Thr Phe Pro Tyr Glu Ser Asn Pro Pro Ile Val Val  
20 25 30

Gly Trp Thr Ala Ala Asp Leu Asp Asn Gly Phe Val Ser Pro Asp Ala  
35 40 45



ES 2 645 921 T3

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

ES 2 645 921 T3

Cys Ala Pro Pro Ala Thr Cys Ser Thr Asn Pro Tyr Tyr Ala Gln Cys  
 305 310 315 320

Leu Asn

<210> 13  
 <211> 761  
 <212> PRT

5 <213> Trichoderma reesei

<400> 13

Ala Phe Ser Trp Lys Asn Val Lys Leu Gly Gly Gly Gly Gly Phe Val  
 1 5 10 15

Pro Gly Ile Ile Phe His Pro Lys Thr Lys Gly Val Ala Tyr Ala Arg  
 20 25 30

Thr Asp Ile Gly Gly Leu Tyr Arg Leu Asn Ala Asp Asp Ser Trp Thr  
 35 40 45

Ala Val Thr Asp Gly Ile Ala Asp Asn Ala Gly Trp His Asn Trp Gly  
 50 55 60

Ile Asp Ala Val Ala Leu Asp Pro Gln Asp Asp Gln Lys Val Tyr Ala  
 65 70 75 80

Ala Val Gly Met Tyr Thr Asn Ser Trp Asp Pro Ser Asn Gly Ala Ile  
 85 90 95

Ile Arg Ser Ser Asp Arg Gly Ala Thr Trp Ser Phe Thr Asn Leu Pro  
 100 105 110

Phe Lys Val Gly Gly Asn Met Pro Gly Arg Gly Ala Gly Glu Arg Leu  
 115 120 125

Ala Val Asp Pro Ala Asn Ser Asn Ile Ile Tyr Phe Gly Ala Arg Ser  
 130 135 140

Gly Asn Gly Leu Trp Lys Ser Thr Asp Gly Gly Val Thr Phe Ser Lys  
 145 150 155 160

Val Ser Ser Phe Thr Ala Thr Gly Thr Tyr Ile Pro Asp Pro Ser Asp  
 165 170 175

Ser Asn Gly Tyr Asn Ser Asp Lys Gln Gly Leu Met Trp Val Thr Phe  
 180 185 190

ES 2 645 921 T3

Asp Ser Thr Ser Ser Thr Thr Gly Gly Ala Thr Ser Arg Ile Phe Val  
 195 200 205  
 Gly Thr Ala Asp Asn Ile Thr Ala Ser Val Tyr Val Ser Thr Asn Ala  
 210 215 220  
 Gly Ser Thr Trp Ser Ala Val Pro Gly Gln Pro Gly Lys Tyr Phe Pro  
 225 230 235 240  
 His Lys Ala Lys Leu Gln Pro Ala Glu Lys Ala Leu Tyr Leu Thr Tyr  
 245 250 255  
 Ser Trp Trp Pro Asp Ala Gln Leu Phe Arg Ser Thr Asp Ser Gly Thr  
 260 265 270  
 Thr Trp Ser Pro Ile Trp Ala Trp Ala Ser Tyr Pro Thr Glu Thr Tyr  
 275 280 285  
 Tyr Tyr Ser Ile Ser Thr Pro Lys Ala Pro Trp Ile Lys Asn Asn Phe  
 290 295 300  
 Ile Asp Val Thr Ser Glu Ser Pro Ser Asp Gly Leu Ile Lys Arg Leu  
 305 310 315 320  
 Gly Trp Met Ile Glu Ser Leu Glu Ile Asp Pro Thr Asp Ser Asn His  
 325 330 335  
 Trp Leu Tyr Gly Thr Gly Met Thr Ile Phe Gly Gly His Asp Leu Thr  
 340 345 350  
 Asn Trp Asp Thr Arg His Asn Val Ser Ile Gln Ser Leu Ala Asp Gly  
 355 360 365  
 Ile Glu Glu Phe Ser Val Gln Asp Leu Ala Ser Ala Pro Gly Gly Ser  
 370 375 380  
 Glu Leu Leu Ala Ala Val Gly Asp Asp Asn Gly Phe Thr Phe Ala Ser  
 385 390 395 400  
 Arg Asn Asp Leu Gly Thr Ser Pro Gln Thr Val Trp Ala Thr Pro Thr  
 405 410 415  
 Trp Ala Thr Ser Thr Ser Val Asp Tyr Ala Gly Asn Ser Val Lys Ser  
 420 425 430  
 Val Val Arg Val Gly Asn Thr Ala Gly Thr Gln Gln Val Ala Ile Ser  
 435 440 445

ES 2 645 921 T3

Ser Asp Gly Gly Ala Thr Trp Ser Ile Asp Tyr Ala Ala Asp Thr Ser  
450 455 460

Met Asn Gly Gly Thr Val Ala Tyr Ser Ala Asp Gly Asp Thr Ile Leu  
465 470 475 480

Trp Ser Thr Ala Ser Ser Gly Val Gln Arg Ser Gln Phe Gln Gly Ser  
485 490 495

Phe Ala Ser Val Ser Ser Leu Pro Ala Gly Ala Val Ile Ala Ser Asp  
500 505 510

Lys Lys Thr Asn Ser Val Phe Tyr Ala Gly Ser Gly Ser Thr Phe Tyr  
515 520 525

Val Ser Lys Asp Thr Gly Ser Ser Phe Thr Arg Gly Pro Lys Leu Gly  
530 535 540

Ser Ala Gly Thr Ile Arg Asp Ile Ala Ala His Pro Thr Thr Ala Gly  
545 550 555 560

Thr Leu Tyr Val Ser Thr Asp Val Gly Ile Phe Arg Ser Thr Asp Ser  
565 570 575

Gly Thr Thr Phe Gly Gln Val Ser Thr Ala Leu Thr Asn Thr Tyr Gln  
580 585 590

Ile Ala Leu Gly Val Gly Ser Gly Ser Asn Trp Asn Leu Tyr Ala Phe  
595 600 605

Gly Thr Gly Pro Ser Gly Ala Arg Leu Tyr Ala Ser Gly Asp Ser Gly  
610 615 620

Ala Ser Trp Thr Asp Ile Gln Gly Ser Gln Gly Phe Gly Ser Ile Asp  
625 630 635 640

Ser Thr Lys Val Ala Gly Ser Gly Ser Thr Ala Gly Gln Val Tyr Val  
645 650 655

Gly Thr Asn Gly Arg Gly Val Phe Tyr Ala Gln Gly Thr Val Gly Gly  
660 665 670

Gly Thr Gly Gly Thr Ser Ser Ser Thr Lys Gln Ser Ser Ser Ser Thr  
675 680 685

Ser Ser Ala Ser Ser Ser Thr Thr Leu Arg Ser Ser Val Val Ser Thr

ES 2 645 921 T3

690 695 700

Thr Arg Ala Ser Thr Val Thr Ser Ser Arg Thr Ser Ser Ala Ala Gly  
705 710 715 720

Pro Thr Gly Ser Gly Val Ala Gly His Tyr Ala Gln Cys Gly Gly Ile  
725 730 735

Gly Trp Thr Gly Pro Thr Gln Cys Val Ala Pro Tyr Val Cys Gln Lys  
740 745 750

Gln Asn Asp Tyr Tyr Tyr Gln Cys Val  
755 760

<210> 14  
<211> 230  
<212> PRT  
5 <213> Trichoderma reesei  
<400> 14

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

Phe Ile Leu Asp Tyr Tyr Tyr Gln Lys Gln Asn Thr Gly His Phe Pro  
20 25 30

Asn Val Ala Gly Trp Tyr Ala Glu Asp Leu Asp Leu Gly Phe Ile Ser  
35 40 45

Pro Asp Gln Tyr Thr Thr Pro Asp Ile Val Cys His Lys Asn Ala Ala  
50 55 60

Pro Gly Ala Ile Ser Ala Thr Ala Ala Ala Gly Ser Asn Ile Val Phe  
65 70 75 80

Gln Trp Gly Pro Gly Val Trp Pro His Pro Tyr Gly Pro Ile Val Thr  
85 90 95

Tyr Val Val Glu Cys Ser Gly Ser Cys Thr Thr Val Asn Lys Asn Asn  
100 105 110

Leu Arg Trp Val Lys Ile Gln Glu Ala Gly Ile Asn Tyr Asn Thr Gln  
115 120 125

Val Trp Ala Gln Gln Asp Leu Ile Asn Gln Gly Asn Lys Trp Thr Val  
130 135 140

Lys Ile Pro Ser Ser Leu Arg Pro Gly Asn Tyr Val Phe Arg His Glu





ES 2 645 921 T3

Ser Ser Asp Asp Asp Lys Asp Ser Ala Ala Ser Met Ser Ala Gln Gly  
 385 390 395 400

Leu Thr Gly Thr Val Leu Phe Thr Val Ala Ala Leu Gly Tyr Met Leu  
 405 410 415

Val Ala Phe

<210> 16  
 <211> 499  
 <212> PRT  
 <213> Bacillus subtilis

5

<400> 16

Met Lys Arg Ser Ile Ser Ile Phe Ile Thr Cys Leu Leu Ile Thr Leu  
 1 5 10 15

Leu Thr Met Gly Gly Met Ile Ala Ser Pro Ala Ser Ala Ala Gly Thr  
 20 25 30

Lys Thr Pro Val Ala Lys Asn Gly Gln Leu Ser Ile Lys Gly Thr Gln  
 35 40 45

Leu Val Asn Arg Asp Gly Lys Ala Val Gln Leu Lys Gly Ile Ser Ser  
 50 55 60

His Gly Leu Gln Trp Tyr Gly Glu Tyr Val Asn Lys Asp Ser Leu Lys  
 65 70 75 80

Trp Leu Arg Asp Asp Trp Gly Ile Thr Val Phe Arg Ala Ala Met Tyr  
 85 90 95

Thr Ala Asp Gly Gly Tyr Ile Asp Asn Pro Ser Val Lys Asn Lys Val  
 100 105 110

Lys Glu Ala Val Glu Ala Ala Lys Glu Leu Gly Ile Tyr Val Ile Ile  
 115 120 125

Asp Trp His Ile Leu Asn Asp Gly Asn Pro Asn Gln Asn Lys Glu Lys  
 130 135 140

Ala Lys Glu Phe Phe Lys Glu Met Ser Ser Leu Tyr Gly Asn Thr Pro  
 145 150 155 160

Asn Val Ile Tyr Glu Ile Ala Asn Glu Pro Asn Gly Asp Val Asn Trp  
 165 170 175



ES 2 645 921 T3

Lys Arg Asp Ile Lys Pro Tyr Ala Glu Glu Val Ile Ser Val Ile Arg  
 180 185 190

Lys Asn Asp Pro Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Thr Gly Thr Trp Ser  
 195 200 205

Gln Asp Val Asn Asp Ala Ala Asp Asp Gln Leu Lys Asp Ala Asn Val  
 210 215 220

Met Tyr Ala Leu His Phe Tyr Ala Gly Thr His Gly Gln Phe Leu Arg  
 225 230 235 240

Asp Lys Ala Asn Tyr Ala Leu Ser Lys Gly Ala Pro Ile Phe Val Thr  
 245 250 255

Glu Trp Gly Thr Ser Asp Ala Ser Gly Asn Gly Gly Val Phe Leu Asp  
 260 265 270

Gln Ser Arg Glu Trp Leu Lys Tyr Leu Asp Ser Lys Thr Ile Ser Trp  
 275 280 285

Val Asn Trp Asn Leu Ser Asp Lys Gln Glu Ser Ser Ser Ala Leu Lys  
 290 295 300

Pro Gly Ala Ser Lys Thr Gly Gly Trp Arg Leu Ser Asp Leu Ser Ala  
 305 310 315 320

Ser Gly Thr Phe Val Arg Glu Asn Ile Leu Gly Thr Lys Asp Ser Thr  
 325 330 335

Lys Asp Ile Pro Glu Thr Pro Ser Lys Asp Lys Pro Thr Gln Glu Asn  
 340 345 350

Gly Ile Ser Val Gln Tyr Arg Ala Gly Asp Gly Ser Met Asn Ser Asn  
 355 360 365

Gln Ile Arg Pro Gln Leu Gln Ile Lys Asn Asn Gly Asn Thr Thr Val  
 370 375 380

Asp Leu Lys Asp Val Thr Ala Arg Tyr Trp Tyr Lys Ala Lys Asn Lys  
 385 390 395 400

Gly Gln Asn Phe Asp Cys Asp Tyr Ala Gln Ile Gly Cys Gly Asn Val  
 405 410 415

Thr His Lys Phe Val Thr Leu His Lys Pro Lys Gln Gly Ala Asp Thr  
 420 425 430

ES 2 645 921 T3

Tyr Leu Glu Leu Gly Phe Lys Asn Gly Thr Leu Ala Pro Gly Ala Ser  
 435 440 445

Thr Gly Asn Ile Gln Leu Arg Leu His Asn Asp Asp Trp Ser Asn Tyr  
 450 455 460

Ala Gln Ser Gly Asp Tyr Ser Phe Phe Lys Ser Asn Thr Phe Lys Thr  
 465 470 475 480

Thr Lys Lys Ile Thr Leu Tyr Asp Gln Gly Lys Leu Ile Trp Gly Thr  
 485 490 495

Glu Pro Asn

<210> 17

<211> 185

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Variante de xilanasa de Bacillus subtilis

<400> 17

Ala Ser Thr Asp Tyr Trp Gln Asn Trp Thr Phe Gly Gly Gly Ile Val  
 1 5 10 15

Asn Ala Val Asn Gly Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Val Asn Trp Ser Asn  
 20 25 30

Thr Gly Asn Phe Val Val Gly Lys Gly Trp Thr Thr Gly Ser Pro Phe  
 35 40 45

Arg Thr Ile Asn Tyr Asn Ala Gly Val Trp Ala Pro Asn Gly Asn Gly  
 50 55 60

Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp Thr Arg Ser Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr  
 65 70 75 80

Val Val Asp Ser Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly  
 85 90 95

Thr Val Lys Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Thr Arg  
 100 105 110

Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Asp Gly Asp Asp Thr Thr Phe Thr Gln Tyr  
 115 120 125

ES 2 645 921 T3

Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Pro Thr Gly Ser Asn Ala Thr Ile  
 130 135 140

Thr Phe Ser Asn His Val Asn Ala Trp Lys Ser His Gly Met Asn Leu  
 145 150 155 160

Gly Ser Asn Trp Ala Tyr Gln Val Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser  
 165 170 175

Ser Gly Ser Ser Asn Val Thr Val Trp  
 180 185

<210> 18

<211> 185

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Variante de xilanasa de Bacillus subtilis

<400> 18

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

Asn Ala Val Asn Gly Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Val Asn Trp Ser Asn  
 20 25 30

Thr Gly Asn Phe Val Val Gly Lys Gly Trp Thr Thr Gly Ser Pro Phe  
 35 40 45

Arg Thr Ile Asn Tyr Asn Ala Gly Val Trp Ala Pro Asn Gly Asn Gly  
 50 55 60

Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp Thr Arg Ser Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr  
 65 70 75 80

Val Val Asp Ser Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly  
 85 90 95

Thr Val Tyr Ser Asp Gly Gly Trp Tyr Asp Ile Tyr Thr Ala Thr Arg  
 100 105 110

Asp Asn Ala Pro Ser Ile Asp Gly Asp Phe Thr Thr Phe Thr Gln Tyr  
 115 120 125

Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Pro Thr Gly Ser Asn Ala Thr Ile  
 130 135 140

Thr Phe Ser Asn His Val Asn Ala Trp Arg Ser His Gly Met Asp Leu

ES 2 645 921 T3

145

150

155

160

Gly Ser Asn Trp Ala Tyr Gln Val Met Ala Thr Glu Gly Tyr Leu Ser  
165 170 175

Ser Gly Ser Ser Asn Val Thr Val Trp  
180 185

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende una enzima que exhibe actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasasa, enzima que comprende un secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO: 1; en combinación con una enzima que presenta actividad de endo-1,3(4)-3-gluconasa, cuya enzima comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 7.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha enzima que exhibe actividad de endo-1,4- $\beta$ -xilanasasa tiene al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1.
- 10 3. El uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en la producción de un producto para bebidas alimenticias, alimentarias o de malta, en la producción de masa o productos horneados, en la preparación de pasta o papel, para la preparación de componentes de cereales, tal como en el que el cereal es el centeno, el trigo o la cebada, en la producción de cerveza o en la modificación de subproductos de un proceso de elaboración de la cerveza, en la producción de vino o zumo, o en la producción de biocombustibles de primera o segunda generación, tal como el bioetanol.
- 15 4. Un método para alterar la filtrabilidad de un material que comprende almidón, comprendiendo dicho método la etapa de tratar dicho material que comprende almidón con una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
- 20 5. Un método para reducir la presión acumulada durante el aclarado en una aplicación de producción de cerveza, comprendiendo dicho método la etapa de tratar una pasta de cerveza con una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
6. Un método para la producción de un producto alimentario, alimenticio o bebida, tal como una bebida alcohólica o no alcohólica, tal como una bebida a base de cereales o de malta, tal como la cerveza o el whisky, comprendiendo dicho método la etapa de tratar un material que comprende almidón con una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
- 25 7. Un método para la producción de una masa para cerveza, comprendiendo dicho método la etapa de tratar un material comprende que almidón con una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
8. Un método para la producción de un biocombustible de primera o segunda generación, tal como el bioetanol, comprendiendo dicho método la etapa de tratar un material que comprende almidón con una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2.

30

Figura 1

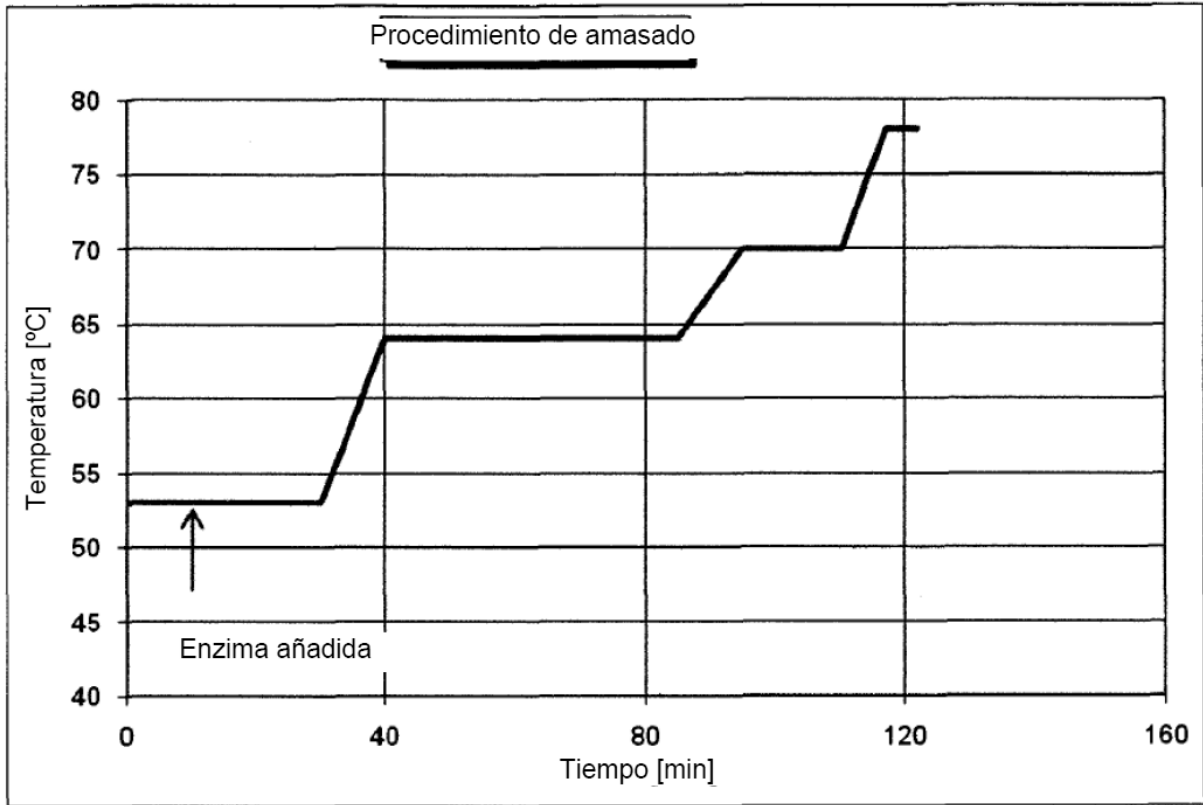


Figura 2

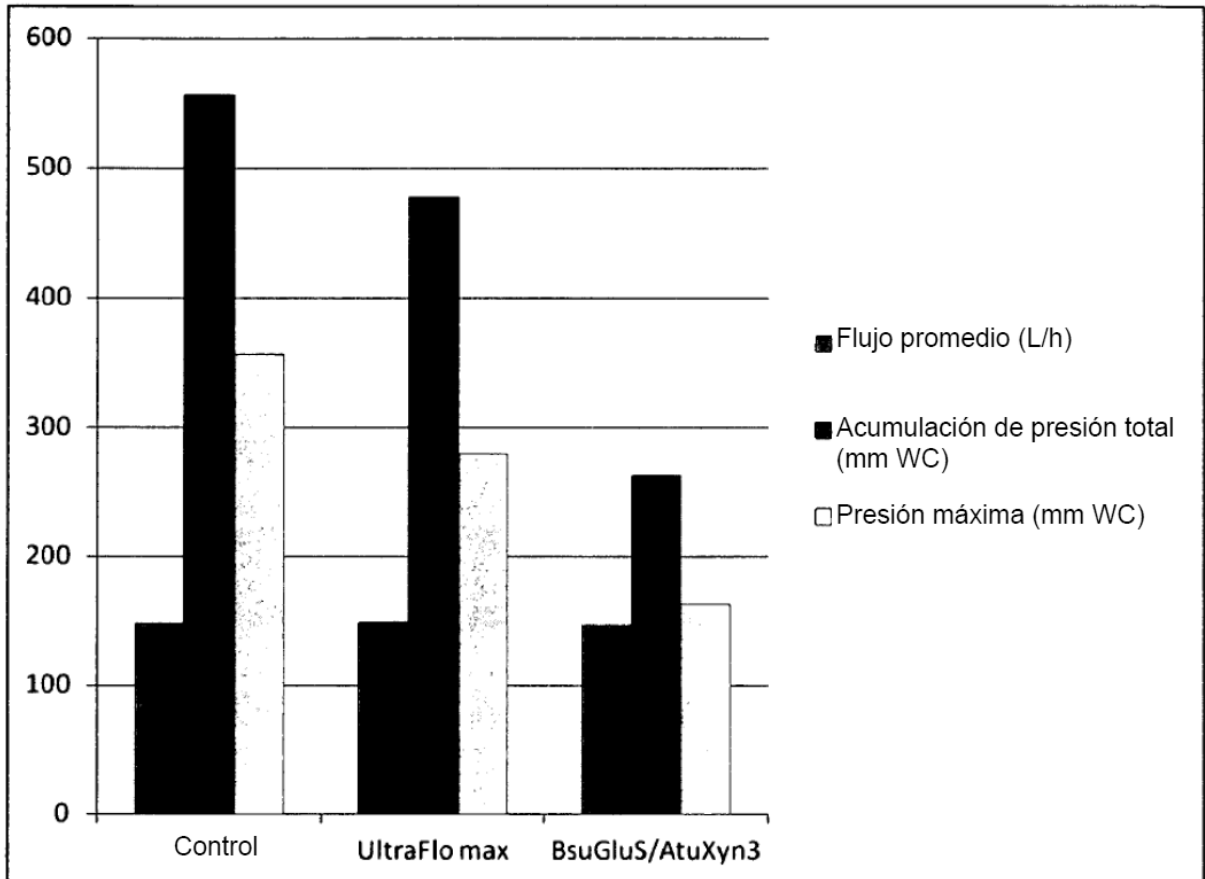


Figura 3

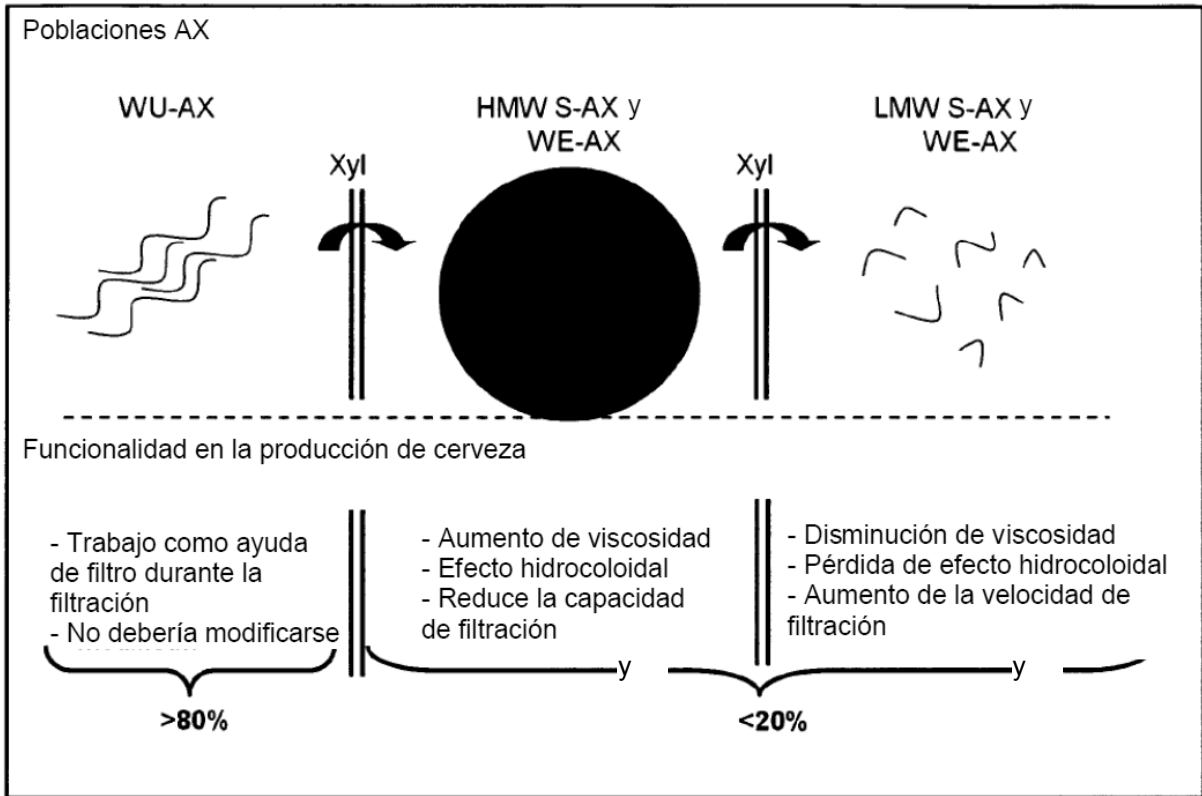




Figura 4

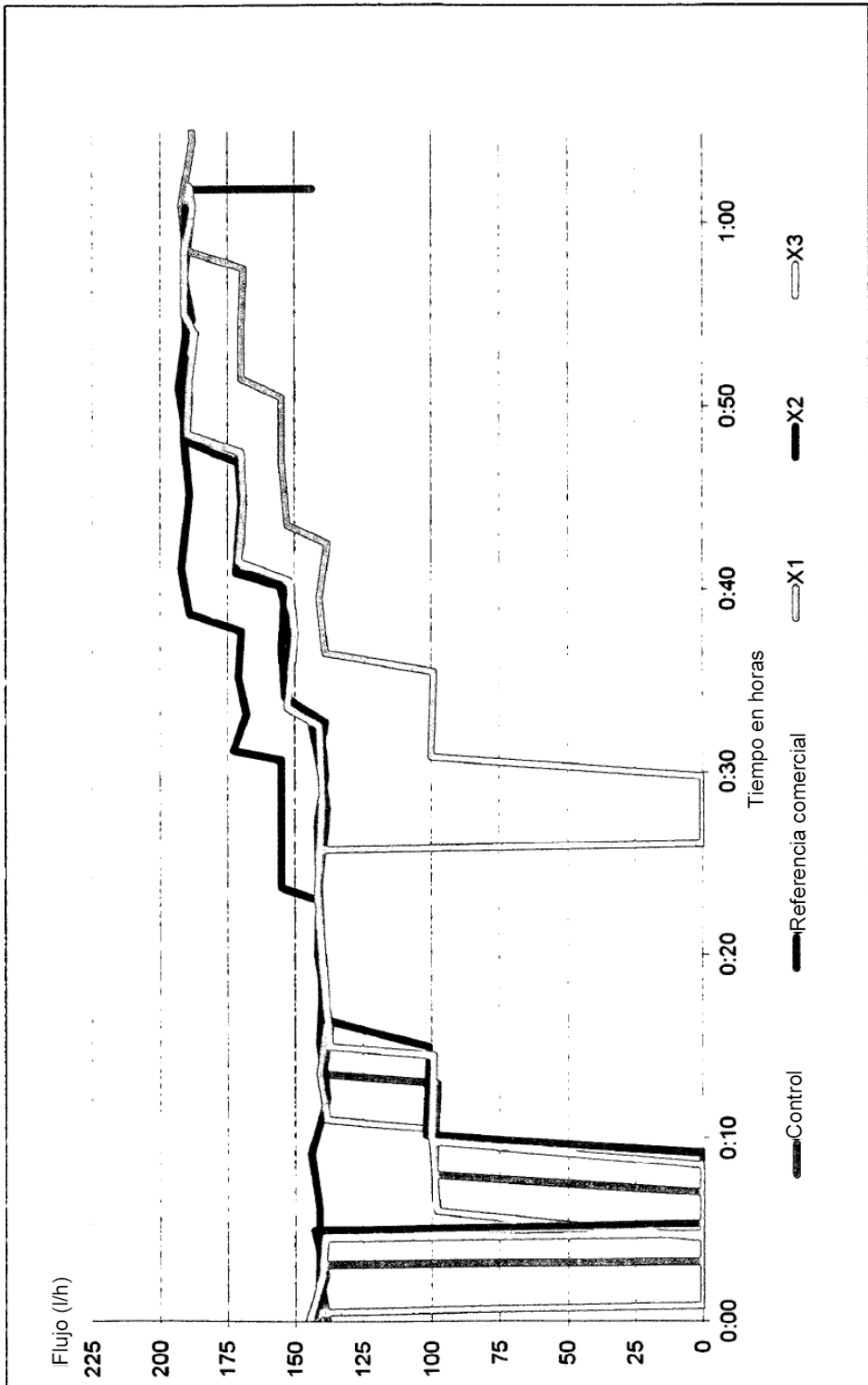


Figura 5

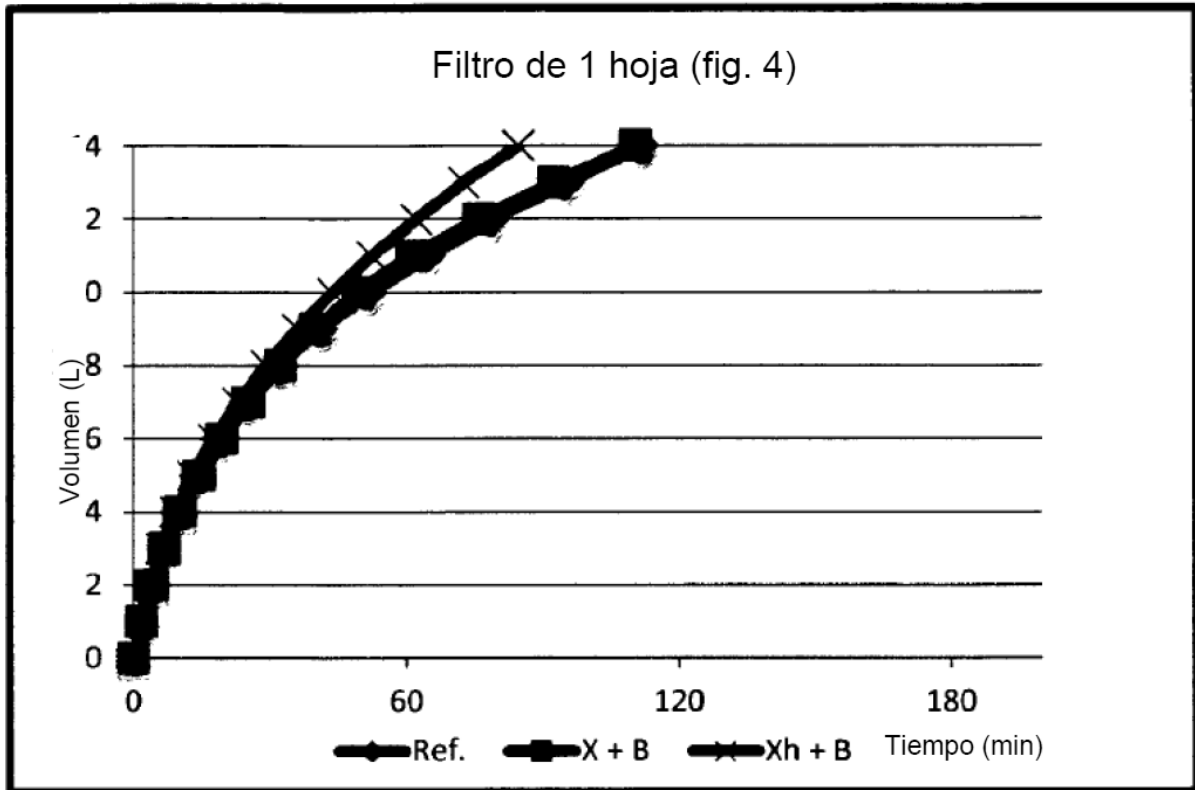


Figura 6

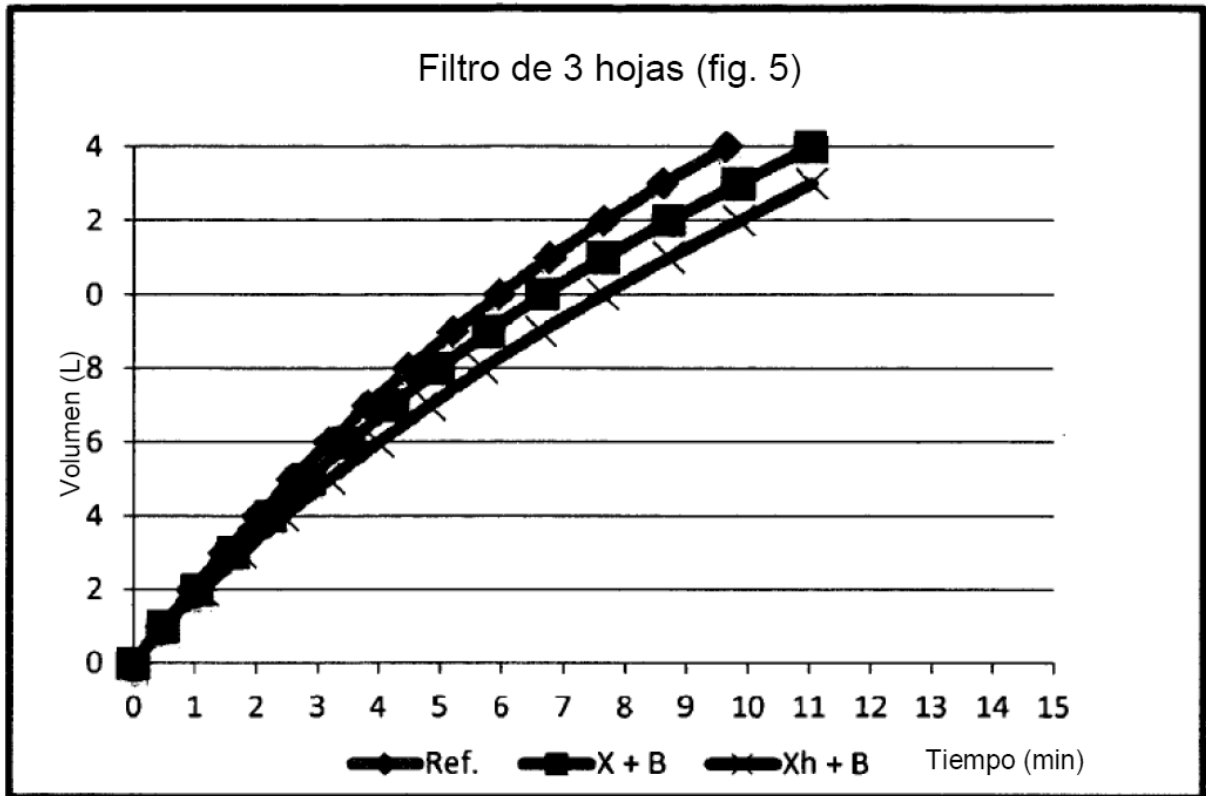


Figura 7

