



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014005873-3 B1



(22) Data do Depósito: 14/09/2012

(45) Data de Concessão: 16/11/2021

(54) Título: COMPOSIÇÃO, USO DE UMA COMPOSIÇÃO, MÉTODO DE ALTERAÇÃO DA FILTRABILIDADE, MÉTODO DE REDUÇÃO DA PRESSÃO ACUMULADA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM ALIMENTO, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PASTA DE BRASSAGEM E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM BIOCOMBUSTÍVEL

(51) Int.Cl.: C12N 9/24; C12N 9/26; C12N 9/30; C12P 7/08.

(30) Prioridade Unionista: 14/09/2011 EP 11181241.8; 14/09/2011 US 61/534,574; 27/07/2012 US 61/676,535.

(73) Titular(es): DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS..

(72) Inventor(es): JENS FRISBÆK SØRENSEN; LONE BRØND MILLER.

(86) Pedido PCT: PCT EP2012068041 de 14/09/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/037933 de 21/03/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 13/03/2014

(57) Resumo: ENZIMA, CONSTRUÇÃO DE DNA, MICROORGANISMO TRANSGÊNICO, PREPARAÇÃO, COMPOSIÇÕES, USO DE UMA ENZIMA, MÉTODO DE ALTERAÇÃO DA FILTRABILIDADE, MÉTODO DE REDUÇÃO DA PRESSÃO ACUMULADA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM ALIMENTO, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PASTA DE BRASSAGEM, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM BIOCOMBUSTÍVEL E PRODUTO. A presente invenção refere-se a novas enzimas com propriedades melhoradas e a composições que compreendem essas enzimas adequadas para uso na produção de um alimento, ração, ou produto de bebida de malte, como em um processo de brassagem (brewing).

“COMPOSIÇÃO, USO DE UMA COMPOSIÇÃO, MÉTODO DE ALTERAÇÃO DA FILTRABILIDADE, MÉTODO DE REDUÇÃO DA PRESSÃO ACUMULADA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM ALIMENTO, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PASTA DE BRASSAGEM E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM BIOCOMBUSTÍVEL”

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se a enzimas com propriedades melhoradas e a composições que compreendem essas enzimas adequadas para uso na produção de um alimento, bebida (por exemplo, cerveja), ração ou biocombustível, como em um processo de brassagem (*brewing*).

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] O uso de enzimas na produção de cerveja é bem conhecido. A aplicação de enzimas para a etapa de maceração para melhorar a filtrabilidade da pasta e aumentar a produção de extrato é descrita no documento WO 97/42302.

[003] Os documentos WO 2005118769 e WO 2005059084 referem-se a uma etapa de maceração e filtração em um processo para a produção de cerveja, e a composições enzimáticas para uso nesse processo.

[004] O documento WO 1999057325 refere-se a linhagens de *Penicillium funiculosum*, a novas misturas enzimáticas obtidas a partir das mesmas e sequências de ácido nucleico dessas.

[005] No entanto, há uma necessidade para enzimas melhoradas, bem como para combinação de enzimas úteis na produção de produtos alimentícios e bebidas, como nas etapas de maceração, cozimento e filtração na produção de uma bebida alcoólica, como cerveja ou uísque.

OBJETO DA INVENÇÃO

[006] É um objeto das realizações da invenção fornecer enzimas adequadas para a produção de produtos alimentícios e bebidas, como na

produção de uma bebida alcoólica ou não alcoólica, como uma bebida à base de cereal ou malte como cerveja ou uísque. As enzimas fornecidas podem ter propriedades melhoradas em relação ao uso na brassagem. Essa ampla variedade de propriedades melhoradas compreende, por exemplo, temperaturas ótimas melhoradas, razão melhorada na atividade entre os substratos arabinosilano solúvel e insolúvel (WE-AX), pressão total acumulada reduzida durante as etapas de clarificação (*lautering*) e/ou filtração de um processo de brassagem, bem como filtrabilidade aumentada de material tratado com enzima.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[007] Foi descoberto pelos presentes inventores que uma ou mais enzimas, bem como certas combinações de enzimas, têm propriedades melhoradas em relação a enzimas conhecidas e combinações de enzimas, particularmente em relação ao uso em um processo de brassagem, em que o material contendo amido é tratado com uma ou mais enzimas para produzir uma pasta de brassagem.

[008] Então, em um primeiro aspecto, a presente invenção refere-se a uma enzima que exibe atividade de endo-1,4- β -xilânase, cuja enzima compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 80% de identidade com qualquer uma selecionada a partir 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 e SEQ ID NO: 18, ou qualquer fragmento funcional das mesmas.

[009] Como usado no presente pedido, “fragmento funcional” refere-se a uma versão truncada de uma enzima com essencialmente a mesma, ou pelo menos um grau significativo de atividade enzimática que a enzima não truncada de referência.

[010] Em um segundo aspecto, a presente invenção refere-se a uma enzima que exibe atividade de endo-1,3(4)- β -glicanase, cuja enzima

compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 80% de identidade com qualquer uma selecionada a partir de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, ou qualquer fragmento funcional das mesmas.

[011] Em um terceiro aspecto, a presente invenção refere-se a uma construção de DNA que compreende uma sequência de DNA que codifica uma enzima de acordo com a invenção.

[012] Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se a um vetor de expressão recombinante que compreende uma construção de DNA que compreende uma sequência de DNA que codifica uma enzima de acordo com a invenção.

[013] Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se a uma célula que foi transformada com uma construção de DNA que compreende uma sequência de DNA que codifica uma enzima de acordo com a invenção.

[014] Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se à preparação que compreende uma enzima, uma construção de DNA, um vetor ou uma célula de acordo com a invenção.

[015] Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se à composição que compreende uma enzima que exibe atividade de endo-1,4- β -xilânase de acordo com a invenção, em combinação com qualquer uma ou mais β -glicanases.

[016] Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se a uma composição que compreende uma enzima que exibe atividade de endo-1,3(4)- β -glicanase de acordo com a invenção, em combinação com qualquer um ou mais xilânases.

[017] Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se ao uso de uma enzima de acordo com a invenção, uma preparação de acordo

com a invenção, ou de uma composição de acordo com a invenção, na produção de um alimento, ração, ou produto de bebida de malte, como cerveja ou uísque.

[018] Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se ao uso de uma enzima de acordo com a invenção, de uma preparação de acordo com a invenção, ou de uma composição de acordo com a invenção, na produção de massas ou produtos assados.

[019] Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se ao uso de uma enzima de acordo com a invenção, de uma preparação de acordo com a invenção, ou de uma composição de acordo com a invenção, na preparação de polpa ou papel.

[020] Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se ao uso de uma enzima de acordo com a invenção, uma preparação de acordo com a invenção, ou de uma composição de acordo com a invenção, para a preparação de componentes cereais. Em algumas realizações o cereal é centeio, trigo ou cevada.

[021] Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se ao uso de uma enzima de acordo com a invenção, uma preparação de acordo com a invenção, ou de uma composição de acordo com a invenção, na produção de cerveja ou modificação de subprodutos a partir do processo de brassagem.

[022] Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se ao uso de uma enzima de acordo com a invenção, uma preparação de acordo com a invenção, ou de uma composição de acordo com a invenção, na produção de vinho ou suco.

[023] Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se ao uso de enzima de acordo com a invenção, uma preparação de acordo com a invenção, ou de uma composição de acordo com a invenção, na produção de

um biocombustível de primeira ou segunda geração, como bioetanol.

[024] Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se a um método de alteração da filtrabilidade de um material que compreende amido, cujo método compreende a etapa de tratamento do dito material que compreende amido, com enzima, com uma preparação ou com uma composição de acordo com a invenção.

[025] Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se a um método de redução de pressão acumulada durante a clarificação em uma aplicação de brassagem, cujo dito método compreende a etapa de tratamento de uma pasta de brassagem, com enzima, com uma preparação ou com uma composição de acordo com a invenção.

[026] Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se a um método para a produção de um produto alimentício, ração ou bebida, como uma bebida alcoólica e não alcoólica, como um cereal ou bebida à base de malte como cerveja ou uísque, cujo dito método compreende a etapa de tratamento de um material que compreende amido, com enzima, com uma preparação ou com uma composição de acordo com a invenção.

[027] Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se a um método para a produção de uma pasta de brassagem, cujo dito método compreende a etapa de tratamento de um material que compreende amido, com uma enzima, com uma preparação ou com uma composição de acordo com a invenção.

[028] Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se a um método para a produção de um biocombustível de primeira ou segunda geração, como bioetanol, cujo dito método compreende a etapa de tratamento de um material que compreende amido, com uma enzima, com uma preparação ou com uma composição de acordo com a invenção.

[029] Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se a

um produto obtido por um método de acordo com a invenção.

[030] Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se a uma composição que compreende o produto obtido por um método de acordo com a invenção, como em que o produto está na faixa de 0,1% a 99,9%.

LEGENDAS PARA AS FIGURAS

[031] Figura 1: Perfil da maceração usada na brassagem em escala laboratorial e escala piloto. A maceração foi iniciada por uma maceração de 10 minutos no período após o qual a enzima foi adicionada.

[032] Figura 2: Aplicação de brassagem em escala piloto a partir da verificação da triagem de glicanase e xilanases. A glicanase S de B sub. combinada com as xilanases de A. tub foi testada em relação ao branco e UltraFlo max. Os dados coletados eram o fluxo médio (L/h), a pressão acumulada total ao longo da clarificação (mm WC, onde 1 mm WC = 9,80665 Pa) e a pressão máxima registrada durante a clarificação.

[033] Figura 3: Funcionalidade de xilanase na brassagem.

[034] Figura 4: Fluxo – clarificação aplicando várias xilanases candidatas.

[035] Figura 5: Filtração de cerveja - média de filtrações repetidas.

[036] Figura 6: Filtração de cerveja - média de filtrações repetidas.

[037] Figura 7: Diagrama de maceração do exemplo 3.

DIVULGAÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[038] A cerveja é tradicionalmente referida como uma bebida alcoólica derivada de malte, como malte derivado de grão de cevada, e opcionalmente adjunto, como material vegetal contendo amido (por exemplo, cereais) e opcionalmente aromatizada, por exemplo, com lúpulo.

[039] No contexto da presente invenção, o termo “cerveja”

significa compreender qualquer mosto fermentado, produzido por fermentação/brassagem de um material vegetal contendo amido, dessa forma, em particular também cerveja produzida exclusivamente a partir de adjunto, ou qualquer combinação de malte e adjunto.

[040] O termo “fermentação” significa no presente contexto, a produção de uma substância como etanol pelo crescimento de microrganismos em uma cultura. Geralmente, microrganismos como levedura são usados para fermentação.

[041] Como usado no presente pedido o termo “malte” é entendido como qualquer cereal, como cevada maltada. “Adjunto” pode ser definido como qualquer material vegetal contendo amido que não seja malte ou malte de cevada.

[042] “Material vegetal contendo amido” pode, por exemplo, ser um ou mais cereais, como cevada, trigo, milho, centeio, sorgo, painço ou arroz, e qualquer combinação dos mesmos. O material vegetal contendo amido pode ser processado, por exemplo, moído, maltado, parcialmente maltado ou não maltado. Cereal não maltado também é chamado “grão cru”. Exemplos de material vegetal não cereal contendo amido compreende, por exemplo, tubérculos como batatas e mandioca.

[043] Como usado no presente pedido, os termos “bebida” e “produto de bebida” inclui essas bebidas fermentadas que formam espuma como cerveja completamente maltada, cerveja fermentada “Reinheitsgebot”, ale, cerveja seca, near beer, cerveja leve, cerveja de baixo teor alcoólico, cerveja de baixa caloria, porter, cerveja bock, stout, licor de malte, cerveja não alcoólica, licor de malte não alcoólico e similares. O termo “bebidas” ou “produto de bebidas” também inclui bebidas que não formam espuma e bebidas de malte alternativas, como bebidas de malte com sabor de frutas, por exemplo, sabor de frutas cítricas como limão, laranja, lima ou bebidas de malte

com sabor de frutas vermelhas, bebidas de malte com sabor de licor, por exemplo, licor de malte com sabor de vodca, rum ou tequila, ou bebidas de malte com sabor de café, como licor de malte com sabor de cafeína, e similares.

[044] A cerveja pode ser feita a partir de uma variedade de material vegetal contendo amido, essencialmente pelo mesmo processo, onde o amido consiste principalmente de homopolímeros de glicose, nos quais os resíduos de glicose estão ligados tanto por ligações alfa-1,4 como alfa-1,6, com o formador predominante.

[045] O processo de fabricação de bebidas fermentadas como cerveja geralmente é referido como brassagem. As matérias-primas tradicionais usadas na fabricação dessas bebidas são água, lúpulo e malte. Em adição ou ao invés do malte, adjuntos como grãos de milho, grãos de milho refinado, levedura moída de fermentador, arroz, sorgo, amido de milho refinado, cevada, amido de cevada, cevada *dehusked*, trigo, amido de trigo, cereal torrado, flocos de cereal, centeio, aveia, batata, tapioca e xaropes, como xarope de milho, xarope de cana-de-açúcar, xarope de açúcar invertido, xaropes de cevada e/ou de trigo, e similares podem ser usados como uma fonte de amido. O amido será eventualmente convertido enzimicamente em açúcares fermentáveis.

[046] Com relação a cervejas feitas predominantemente de malte (por exemplo, até 15 a 20% de adjunto), por várias razões, o malte, que é produzido principalmente de variedades selecionadas de cevada, tem o efeito maior no caráter total e qualidade da cerveja. Primeiro, o malte é o agente principal de sabor na cerveja. Segundo, o malte fornece a principal porção do açúcar fermentável. Terceiro, o malte fornece as proteínas, que contribuirão para o corpo e caráter de espuma da cerveja. Quarto, o malte fornece a atividade enzimática necessária durante a maceração.

[047] O lúpulo também contribui significativamente para a qualidade de cerveja, incluindo sabor. Em particular, o lúpulo (ou constituintes do lúpulo) adicionam substâncias amargas desejáveis à cerveja. Além disso, o lúpulo age como precipitante de proteínas, estabelece agentes conservantes e ajuda na formação e estabilização de espuma. Nem todas as cervejas são produzidas com o uso de lúpulo. Outros agentes estabilizantes, como as proteases (por exemplo, papaína) também podem ser usados.

**SEM QUERER SER INTERPRETADO COMO LIMITANTE PARA A PRESENTE INVENÇÃO,
UM PROCESSO DE BRASSAGEM CONVENCIONAL PODE SER DESCRITO COMO A
SEGUIR:**

[048] O processo para fabricação de cerveja é bem conhecido na técnica, mas em resumo, envolve cinco passos: (a) maceração e/ou cozimento com adjunto (b) separação e extração do mosto (c) fervura e lupagem (d) resfriamento, fermentação e armazenamento, e (e) maturação, processamento e embalagem. Tipicamente, na primeira etapa, o malte moído ou esmagado é misturado com água e mantido um período de tempo sob temperaturas controladas para permitir que as enzimas presentes no malte convertam o amido presente no malte em açúcares fermentáveis.

[049] Na segunda etapa, a pasta é transferida para um “tonel de calificação” ou filtração da pasta, onde o líquido é separado do resíduo de grão. Este líquido doce é chamado “mosto” e o resíduo de grão restante é chamado de “grão usado”. A pasta é tipicamente submetida a uma extração, que envolve a adição de água à pasta para recuperar o extarto solúvel residual do grão usado.

[050] Na terceira etapa, o mosto é fervido vigorosamente. Isto esteriliza o mosto e ajuda a desenvolver a cor, sabor e odor. O lúpulo é adicionado em algum ponto durante a fervura.

[051] Na quarta etapa, o lúpulo é resfriado e é transferido para

um fermentador, que contém tanto levedura como ao qual a levedura é adicionada. A levedura converte os açúcares por fermentação em álcool e dióxido de carbono; no final da fermentação o fermentor é resfriado ou o fermentor pode ser resfriado para interromper a fermentação. A levedura flocula e é removida.

[052] Na última etapa, a cerveja é resfriada e é armazenada por um período de tempo, durante o qual a cerveja clareia e seu sabor se revela, e qualquer material que talvez comprometa a aparência, sabor e validade da cerveja se decanta. Antes de embalagem, a cerveja é gaseificada e, opcionalmente, filtrada e pasteurizada.

[053] Após a fermentação, é obtida uma bebida que usualmente contém de cerca de 2% a cerca de 10%, em peso, de álcool. Os carboidratos não fermentáveis não são convertidos durante a fermentação e formam a maioria dos sólidos dissolvidos na cerveja final.

[054] Este resíduo permanece devido à incapacidade amilases de malte hidrolizarem as ligações alfa-1,6 do amido. Os carboidratos não fermentáveis contribuem com cerca de 50 calorias por 12 onças (340,19 g) de cerveja.

[055] Recentemente, havia uma popularização difundida de bebidas fermentadas chamadas cervejas leves, cervejas com redução de calorias ou cervejas com baixa caloria, particularmente no mercado dos E.U.A. Como definido nos E.U.A, estas cervejas têm aproximadamente 30% menos calorias que uma cerveja “normal” do fabricante.

[056] Outras informações sobre os processos de brassagem convencionais, bem como as definições dos termos usados no domínio da tecnologia de brassagem a serem aplicados para a presente invenção, podem ser encontradas em “Technology Brewing and Malting” by Wolfgang Kunze of the Research and Teaching Institute of Brewing, Berlin (VLB), 2ª Edição

revisada de 1999, ISBN 3-921690-39-0, 3ª edição (2004): ISBN 3-921690-49-8, 4ª edição atualizada, 2010 (ISBN 978-3-921690-64-2).

[057] As xilanases são classificadas como EC 3.2.1.8, EC 3.2.1.32, EC 3.2.1.136 e EC 3.2.1.156; suas atividades podem ser medidas, por exemplo, conforme descrito nos exemplos. Xilanases adequadas a serem usadas em combinação com uma enzima que exibe atividade de endo-1,3(4)- β -glicanase de acordo com a invenção inclui qualquer xilanase classificada como EC 3.2.1.8, EC 3.2.1.32, EC 3.2.1.136 e EC 3.2.1.156, como qualquer uma divulgada nos documentos WO 2010072226, WO 2010072225, WO 2010072224, WO 2005059084, WO 2007056321, WO 2008023060A, WO9421785, WO 2006114095, WO 2006066582, patente US 2008233175 e documento WO10059424.

[058] A endo-1,4-beta xilanase é classificada como EC 3.2.1.8. A enzima causa endo-hidrólise de ligações 1,4-beta-D-xilosídicas em xilanos.

[059] Os termos “família 11 de xilanase”, “família 11 de hidrolase de glicosídeo (GH)” ou simplesmente “xilanase GH 11”, como usado no presente pedido, refere-se a uma endo-1,4-beta xilanase classificada como EC 3.2.1.8, que causa endo-hidrólise de ligações 1,4-beta-D-xilosídicas em xilanos e que é classificada como uma família xilanase 11 de acordo com B. Henrissat, A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280 (1991), páginas 309–316.

[060] Os termos “família 10 de xilanase”, “família 10 de hidrolase de glicosídeo (GH)” ou simplesmente “xilanase GH 10”, compreende enzimas de atividades conhecidas como xilanase (EC:3.2.1.8); endo-1,3-beta-xilanase (EC:3.2.1.32); celobiohidrolase (EC:3.2.1.91). Essas enzimas eram anteriormente conhecidas como família F de celulase.

[061] Em algumas realizações a enzima que exibe atividade endo-1,4- β -xilanase é uma família 11 de xilanase. Em algumas realizações a

enzima que exibe atividade endo-1,4- β -xilanase é uma família 10 de xilanase.

[062] Em um aspecto, a composição de enzimas de acordo com a invenção tem atividade de endo-1,4-beta xilanase, conforme medido pelo ensaio descrito nos exemplos.

[063] Um ensaio para medir atividade de xilanase pode ser realizado em pH 3,5 ou pH 5 e 50°C com o uso de xilano como substrato, ou pode ser realizado em pH diferente e valores de temperatura para a caracterização adicional e especificação de enzimas. A atividade enzimática é calculada a partir do aumento na absorbância causada por xilose a 540 nm por unidade de tempo.

[064] Em algumas realizações, a composição de enzimas de acordo com a invenção compreende uma atividade de xilanase de pelo menos cerca de 5000 U/g, como pelo menos cerca de 6000 U/g, como pelo menos cerca de 7000 U/g, como pelo menos cerca de 8000 U/g, como pelo menos cerca de 8500 U/g, conforme medido no ensaio descrito nos exemplos.

[065] A composição de enzimas de acordo com a invenção pode ter atividade celulolítica. O nome sistemático da celulase é 44-(1,3;1,4)- β -D-glicano 4-glicanohidrolase e enzimas celulolíticas ou celulases são classificadas como EC 3.2.1.4. A celulase realiza endo-hidrólise de ligações 1 \rightarrow 4)- β -D-glicosídicas, por exemplo, na celulose, liquenina e β -D-glicanos de cereal e também irá hidrolisar ligações 1,4- em β -D-glicanos contendo também ligações 1,3. As celulase também tem outros nomes como endo-1,4- β -D-glicanase, β -1,4-glicanase, β -1,4-endoglicano hidrolase, celulase A, celulosina AP, endoglicanase D, celulase alcalina, celulase A 3, celudextrinase, celulase 9.5, avicelase, pancelase SS e 1,4-(1,3;1,4)- β -D-glicano 4-glicanohidrolase.

[066] Em um aspecto da invenção, a atividade de celulase da composição de enzimas de acordo com a invenção, é medida pelo método de “atividade de celulase”, conforme descrito a seguir no subtítulo “Ensaio”.

[067] Em aspectos adicionais, a presente invenção refere-se a enzimas que têm atividade de endo-1,3(4)- β -glicanase que é determinada pelo ensaio descrito nos Exemplos.

[068] “ β -glicanase” ou “beta-glicanase”, como usado no presente pedido, refere-se a uma endo-1,3(4)-beta-glicanase de EC 3.2.1.6. Na catálise da endo-hidrólise de ligações (1->3) ou (1->4) em beta-D-glicanos quando o resíduo de glicose cujo grupo redutor envolvido na ligação a ser hidrolisada é ele mesmo, este é substituído em C-3. Beta-glicanases adequadas a serem usadas em combinação com uma enzima que exibe atividade de endo-1,4- β -xilânase de acordo com a invenção inclui qualquer beta-glicanase divulgada nos documentos WO 2004087889, WO 2005059084, WO 9414953, WO 2007056321, WO 9531533, WO 08023060, WO 2005100582, WO 9828410, WO 9742301, WO 2006066582, WO 05118769, WO 2005003319 e WO 10059424.

[069] O ensaio padrão é realizado em pH 5,0, e pode ser realizado em valores diferentes de pH para a caracterização adicional e especificação de enzimas.

[070] Uma unidade de atividade de endo-1,3(4)- β -glicanase é definida como a quantidade de enzima que produz equivalente a 1 μ mol de glicose por minuto sob condições do ensaio (pH 5,0 (ou conforme especificado) e 50°C).

[071] Em algumas realizações, a composição de enzimas de acordo com a invenção compreende uma atividade de β -glicanase de pelo menos cerca de 10000 U/g, como pelo menos cerca de 12000 U/g, como pelo menos cerca de 14000 U/g, como pelo menos cerca de 15000 U/g, como pelo menos cerca de 18000 U/g, conforme medido no ensaio descrito nos exemplos.

[072] Em aspectos adicionais, a composição de enzimas de acordo com a invenção tem atividade de laminarinase ou compreende qualquer

uma ou mais enzimas adicionais que têm atividade de laminarinase. A atividade de laminarinase é determinada conforme descrito no ensaio de laminarinase descrito na seção de Ensaio.

[073] A laminarinase pode ser uma endo-1,3(4)-beta-glicanase classificada como E.C. 3.2.1.6 ou glicano endo-1,3-beta-D-glicosidase classificada como E.C. 3.2.1.39. A endo-1,3(4)-beta-glicanase com os nomes alternativos, laminarinase, endo-1,3-beta-glicanase, endo-1,4-beta-glicanase é classificada como E.C. 3.2.1.6. Os substratos incluem laminarina, liquenina e D-glicanos de cereal e a enzima que catalisa a endo-hidrólise de ligações (1->3) ou (1->4) em beta-D-glicanos quando o resíduo de glicose cujo grupo redutor está envolvido na ligação a ser hidrolisada é por si mesmo substituído em C-3. Glicano endo-1,3-beta-D-glicosidase com os nomes alternativos (1->3)-beta-glican endohidrolase, endo-1,3-beta-glicanase e laminarinase é classificada como E.C. 3.2.1.39 e hidrolisa ligações (1->3)-beta-d-glicosídicas em (1->3)-beta-D-glicanos em substratos como, por exemplo, laminarina, paramilon e paquimano.

[074] Em alguns aspectos, a composição de enzimas de acordo com a invenção tem atividade de arabinanase ou compreende uma enzima adicional que tem atividade de arabinanase. A arabinanase é classificada como CE 3.2.1.99. O nome sistemático é 5- α -L-arabinana 5- α -L-arabinanohidrolase, mas tem vários outros nomes como arabinana endo-1,5- α -L-arabinosidase, e endo-1,5- α -L-arabinanase, endo-1,5- α -L-arabanase, endo-arabanase e 1,5- α -L-arabinana e 1,5- α -L-arabinanohidrolase. A arabinase hidrolisa ligações (1 \rightarrow 5)- α -arabinofuranosídicas em (1 \rightarrow 5)-arabinanas. A arabinanase também age na arabinana.

[075] Em um aspecto da invenção, a atividade de arabinase da composição de enzimas de acordo com a invenção, é medida pelo ensaio de arabinase, conforme descrito a seguir no subtítulo "Ensaio". O ensaio pode ser

realizado em pH 3,5 e 50°C, com o uso de arabinana de açúcar de beterraba sacarina como substrato, e pode ser realizado em diferentes valores de pH e temperatura para a caracterização adicional e especificação de enzimas. A atividade enzimática é calculada a partir do aumento na absorbância a 540 nm por unidade de tempo.

[076] Uma unidade de atividade de arabinase é definida como a quantidade de enzima (normalizada para o volume de ensaio total) que fornece um aumento na $\Delta OD_{540nm} \cdot \text{min}^{-1}$ mediante as condições de ensaio (pH 3,5 e 50°C).

[077] Em alguns aspectos, a composição de enzimas de acordo com a invenção tem atividade de beta-D-glicosídeo glicohidrolase ou compreende uma enzima adicional que tem atividade de beta-D-glicosídeo glicohidrolase. A beta-D-glicosídeo glicohidrolase refere-se a enzimas de E.C 3.2.1.21.

[078] Em alguns aspectos, a composição de enzimas de acordo com a invenção tem atividade de β -xilosidase ou compreende uma enzima adicional que tem atividade de β -xilosidase. A “ β -xilosidase” ou “xilano 1,4-beta-xilosidase” refere-se a enzimas de E.C 3.2.1.37. A β -xilosidase catalisa a hidrólise de (1->4)-beta-D-xilanos, para remover resíduos sucessivos de D-xilose de terminações não redutoras.

[079] Em alguns aspectos da invenção, a composição de enzimas de acordo com a invenção tem atividade de celobiohidrolase ou compreende uma enzima adicional que tem atividade de celobiohidrolase. “Celobiohidrolase” ou “Celulose 1,4-beta-celobiosidase” refere-se a enzimas de EC 3.2.1.91. A celulose 1,4-beta-celobiosidase catalisa a hidrólise de ligações 1,4-beta-D-glicosídicas em celulose e celotetraose, liberando celobiose das extremidades não redutoras das cadeias.

[080] A atividade de celobiohidrolase da composição de enzimas

de acordo com a invenção é medida pelo ensaio de celobiohidrolase, conforme descrito a seguir no subtítulo “Ensaio”. O ensaio padrão é realizado em pH 5,0, e pode ser realizado em valores diferentes de pH para a caracterização adicional e especificação de enzimas.

[081] Uma unidade de atividade de celobiohidrolase é definida como a quantidade de enzima que produz equivalente a 1 μ mol de p-nitrofenil β -D-celobiopiranosídeo por minuto sob condições do ensaio (pH 5,0 (ou conforme especificado) e 50°C).

[082] Em alguns aspectos, a composição de enzima de acordo com a invenção tem atividade de α -N-arabinofuranosidase ou compreende uma enzima adicional que tem atividade de α -N-arabinofuranosidase. “ α -N-arabinofuranosidase” ou “Alfa-N-arabinofuranosidase” refere-se a enzimas de EC 3.2.1.55. α -N-arabinofuranosidase catalisa a hidrólise de resíduos de alfa-L-arabinofuranosídeo terminais não redutores em alfa-L-arabinosídeos.

[083] Em um aspecto da invenção, a atividade de arabinofuranosidase da composição de enzimas de acordo com a invenção é medida pelo ensaio de arabinofuranosidase conforme descrito a seguir no subtítulo “Ensaio”. O ensaio padrão pode ser realizado em pH 5,0 e 50°C, e pode ser realizado em valores diferentes de pH e temperatura para a caracterização adicional e especificação de enzimas.

[084] Uma unidade de atividade de α -N-arabinofuranosidase é definida como a quantidade de enzima que produz equivalente a 1 μ mol de p-nitrofenol α -N-arabinofuranosidase por minuto sob condições do ensaio (pH 5,0 e 50°C (ou conforme especificado)).

[085] Em alguns aspectos, a composição de enzima de acordo com a invenção tem atividade de glicano 1,4-beta-glicosidase ou compreende uma enzima adicional que tem atividade de glicano 1,4-beta-

glicosidase. “Glicano 1,4-beta-glicosidase” ou “glicano 1,4-beta-glicosidase” refere-se a enzimas de E.C3.2.1.74. A glicano 1,4-beta-glicosidase catalisa a hidrólise de ligações (1->4) em (1->4)-beta-D-glicanos, para remover sucessivas unidades de glicose.

[086] Em alguns aspectos, a composição de enzimas de acordo com a invenção tem atividade de exo-beta-1,4-glicanase específica de xiloglicano ou compreende uma enzima adicional que tem atividade de exo-beta-1,4-glicanase específica de xiloglicano. “Exo-beta-1,4-glicanase específica de xiloglicano” refere-se a enzimas de E.C 3.2.1.155. Exo-beta-1,4-glicanase específica de xiloglicano catalisa a exohidrólise de ligações (1->4)-beta-D-glicosídicas em xiloglicano.

[087] As enzimas e composições de enzimas de acordo com os aspectos de procedimentos podem ser usadas em um processo que compreende reduzir a viscosidade de uma solução aquosa que compreendem um hidrolisado de amido.

[088] As enzimas e composições de enzimas também podem ser usadas em um processo que compreende filtrar uma solução aquosa que compreende um hidrolisado de amido. Em algumas realizações, a solução aquosa que compreende um hidrolisado de amido é uma pasta para fabricar cerveja, e em outras realizações a solução aquosa que compreende um hidrolisado de amido é uma composição alimentícia.

[089] De maneira alternativa, a composição de enzimas de acordo com a presente invenção pode ser usada na produção de suco de frutas, vinho, processamento de grão, álcool para combustível, biocombustível de primeira ou segunda geração, como bioetanol, e álcool potável.

[090] Em algumas realizações, o biocombustível de primeira ou segunda geração como bioetanol é produzido a partir de estoques agrícolas de

ração como cana-de-açúcar, batata, milho, trigo, sorgo, etc., ou a partir de material celulósico como palha de milho, grama ou outro material vegetal. Em ambos os casos, açúcares fermentáveis são extraídos a partir de matéria-prima e fermentados por microrganismos em álcool, que é destilado e pode ser usado como combustível para transporte. A composição de enzimas de acordo com a presente invenção pode ser usada nessa produção de biocombustível. O complexo de enzimas pode ser adicionado para melhorar a extração de polissacarídeos da matéria-prima, ajudar a degradar polissacarídeos inferiores em açúcares fermentáveis e/ou melhorar os parâmetros de processamento como separação de líquidos de sólidos, características de fluxo e bombeamento.

[091] O processo da invenção pode ser aplicado na maceração de qualquer *grist*. De acordo com a invenção, o *grist* pode compreender qualquer amido e/ou açúcar contendo material vegetal derivado de qualquer planta ou parte de planta, incluindo tubérculos, raízes, talos, folhas e sementes.

[092] Em algumas realizações, o *grist* compreende grão, como grãos de cevada, trigo, centeio, aveia, milho, arroz, milo, painço e sorgo, e mais preferencialmente, pelo menos 10%, ou mais preferencialmente pelo menos 15%, ainda mais preferencialmente pelo menos 25%, ou com a máxima preferência pelo menos 35%, como pelo menos 50%, pelo menos 75%, pelo menos 90% ou mesmo 100% (p/v) do *grist* do mosto é derivado de grãos.

[093] Em algumas realizações o *grist* compreende grão maltado, como malte de cevada. Preferencialmente, pelo menos 10%, ou mais preferencialmente pelo menos 15%, ainda mais preferencialmente pelo menos 25%, ou com a máxima preferência pelo menos 35%, como pelo menos 50%, pelo menos 75%, pelo menos 90% ou mesmo 100% (p/v) do *grist* do mosto é derivado de grão de maltado.

[094] O termo “pasta” é entendido como pasta aquosa de amido, por exemplo, que compreende malte de cevada esmagada, cevada esmagada, e/ou outro adjunto ou uma combinação dos mesmos, misturados com água para mais tarde serem separados em mosto + grãos usados.

[095] O termo “separação de pasta” é entendido como a separação de mosto a partir dos grãos usados, como por clarificação ou filtração da pasta.

[096] O termo “filtração de cerveja” é entendido como um processo de separação no qual as células de levedura e outros materiais que causam turbidez, ainda presentes na cerveja, são removidos por microfiltração ou processos de membrana.

[097] A preparação de enzima, como sob a forma de um ingrediente de alimento preparado de acordo com a presente invenção, pode estar sob forma de uma solução ou como um sólido, dependendo do uso e/ou do modo de aplicação e/ou do modo de administração. A forma sólida pode ser tanto como um pó de enzima seco ou como uma enzima granulada.

[098] Em um aspecto, a invenção fornece uma preparação de composição de enzimas que compreende a enzima ou composição de enzimas de acordo com a invenção, um carreador de enzima e opcionalmente um estabilizante e/ou um conservante.

[099] Em ainda um aspecto adicional da invenção, o carreador de enzima é selecionado a partir do grupo que consiste em glicerol ou água.

[0100] Em um aspecto adicional, a preparação compreende um estabilizante. Em um aspecto, o estabilizante é selecionado a partir do grupo que consiste em sais inorgânicos, poliois, açúcares e combinações dos mesmos. Em um aspecto, o estabilizante é um sal inorgânico como cloreto de potássio. Em outro aspecto, o poliol é glicerol, propilenoglicol ou sorbitol. Em ainda outro aspecto, o açúcar é um carboidrato de molécula pequena, em

particular qualquer um de vários com sabor como glicose, frutose e sacarose.

[0101] Ainda em um aspecto adicional, a preparação compreende um conservante. Em um aspecto, o conservante é metil parabeno, propil parabeno, benzoato, sorbato ou outro conservante de alimentos aprovado ou uma mistura dos mesmos.

REALIZAÇÕES ESPECÍFICAS DA INVENÇÃO

[0102] Em algumas realizações, a enzima que exibe atividade de endo-1,4- β -xilanase, opcionalmente em combinação com qualquer um ou mais β -glicanases de acordo com a presente invenção fornece uma viscosidade significativamente reduzida nas aplicações de brassagem, facilitando a maceração melhorada e separação da cerveja.

[0103] Características de xilanase desejáveis para aplicações de brassagem podem incluir um ou mais dos seguintes aspectos:

A) ESPECIFICIDADE DE SUBSTRATO DE ENZIMA

[0104] A razão WE-AX/WU-AX tem um impacto importante na viscosidade. Em algumas realizações, esta razão é menor que cerca de 7,0, como menor que cerca de 6,5, como menor que cerca de 6,0, como menor que cerca de 5,5, como menor que cerca de 5,0, como menor que cerca de 4,5.

B) SELETIVIDADE DE SUBSTRATO DE ENZIMA

[0105] Acredita-se ter um impacto na funcionalidade quanto mais próximo aos pontos de ramificação a enzima cortar.

C) TERMOESTABILIDADE DA ENZIMA

[0106] Solubilização contínua de AX durante a maceração – termoestabilidade, uma característica chave. Conseqüentemente, em algumas realizações, a enzima que exibe atividade endo-1,4- β -xilanase de acordo com a presente invenção é termoestável dentro de uma faixa de temperatura de 65 a 78°C.

D) PH ÓTIMO DE ENZIMA

[0107] Conseqüentemente, em algumas realizações, a enzima

que exibe atividade endo-1,4- β -xilanase tem um pH ótimo na faixa de pH 5,4 a 5,6.

E) INIBIÇÃO DA ENZIMA (POR EXEMPLO, FATOR CHAVE CONHECIDO PARA XILANASES)

[0108] A dita viscosidade significativamente reduzida em aplicações de brassagem pode ser medida como uma viscosidade reduzida na aplicação de brassagem, em comparação a um controle com uma enzima conhecida ou combinação de atividades de enzima, como Ultraflo®Max usado sob as mesmas condições e quantidades.

[0109] Em algumas realizações, a enzima que exibe atividade endo-1,4- β -xilanase de acordo com a presente invenção, opcionalmente em combinação com qualquer uma ou mais β -glicanases de acordo com a presente invenção fornece para uma maceração e separação de cerveja melhoradas nas aplicações de brassagem.

[0110] Em algumas realizações, a enzima que exibe atividade endo-1,4- β -xilanase de acordo com a presente invenção, opcionalmente em combinação com qualquer uma ou mais β -glicanases de acordo com a presente invenção fornece um potencial reduzido para formação de *off flavour*, como formação de *off flavour* relacionado à quebra de arabinoxilano.

[0111] Em algumas realizações, a enzima que exibe atividade endo-1,4- β -xilanase de acordo com a presente invenção, opcionalmente em combinação com qualquer uma ou mais β -glicanases de acordo com a presente invenção fornece para um risco reduzido de colapso no leito de filtração, como na clarificação.

[0112] Em algumas realizações, a enzima que exibe atividade endo-1,4- β -xilanase de acordo com a presente invenção, opcionalmente em combinação com qualquer uma ou mais β -glicanases de acordo com a presente invenção fornece um potencial reduzido para redução no potencial de

off flavour e/ou redução na formação de *off flavour*. Um aspecto da invenção refere-se a uma enzima que exibe atividade de endo-1,4- β -xilânase, cuja enzima compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 80% de identidade com qualquer uma selecionada a partir 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 e SEQ ID NO: 18, ou qualquer fragmento funcional das mesmas.

[0113] Outro aspecto refere-se a uma enzima que exibe atividade de endo-1,3(4)- β -glicanase, caracterizada pelo fato da enzima compreender uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 80% de identidade com qualquer uma selecionada a partir de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, ou qualquer fragmento funcional das mesmas.

[0114] Em algumas realizações da invenção, a enzima que exibe atividade de endo-1,4- β -xilânase tem uma razão na atividade entre substrato arabinóxilano solúvel (WE-AX) e substrato arabinóxilano insolúvel (WU-AX) menor que cerca de 7,0, como menor que cerca de 6,5, como menor que cerca de 6,0, como menor que cerca de 5,5, como menor que cerca de 5,0, como menor que cerca de 4,5.

[0115] Em algumas realizações, a enzima de acordo com a invenção tem uma temperatura ótima na faixa de 40 a 70°C, como na faixa de 45 a 65°C, como na faixa de 50 a 65°C, como na faixa de 55 a 65°C.

[0116] Em algumas realizações a enzima de acordo com a invenção tem pelo menos 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99% identidade com qualquer uma das sequências de aminoácidos selecionadas a partir de SEQ ID NO: 1 a 18, ou qualquer fragmento funcional das mesmas.

[0117] Em algumas realizações, Em algumas realizações a

enzima de acordo com a invenção tem um número total de aminoácidos menor que 350, como menor que 340, como menor que 330, como menor que 320, como menor que 310, como menor que 300 aminoácidos, como na faixa de 200 a 350, como na faixa de 220 a 345 aminoácidos.

[0118] Em algumas realizações, a sequência de aminoácidos da dita enzima de acordo com a invenção tem pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove ou dez substituições de aminoácidos, em comparação com qualquer sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NO: 1 a 18, ou qualquer fragmento funcional das mesmas.

[0119] Em algumas realizações, a sequência de aminoácidos da dita enzima de acordo com a invenção tem no máximo uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove ou dez substituições de aminoácidos, em comparação com qualquer sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NO: 1 a 18, ou qualquer fragmento funcional das mesmas.

[0120] Em algumas realizações, a enzima de acordo com a invenção compreende a sequência de aminoácidos identificada como qualquer uma de SEQ ID NO: 1 a 18, ou qualquer fragmento funcional das mesmas.

[0121] Em algumas realizações, a enzima de acordo com a invenção consiste na sequência de aminoácidos identificada por qualquer uma de SEQ ID NO: 1 a 18, ou qualquer fragmento funcional das mesmas.

[0122] Um aspecto importante adicional da invenção refere-se a uma composição que compreendem uma enzima que exibir atividade endo-1,4- β -xilânase de acordo com a invenção, em combinação com qualquer uma ou mais β -glicosidases. Em algumas realizações esta uma ou mais β -glicosidases é de acordo com a invenção.

[0123] Um aspecto importante adicional da invenção é uma composição que compreende uma enzima que exibe atividade de endo-1,3(4)- β -glicosidase de acordo com a invenção, em combinação com qualquer um ou

mais xilanases. Em algumas realizações esta ou mais xilanases é uma enzima que exibe atividade de endo-1,4- β -xilanase de acordo com a invenção. Em algumas realizações, esta uma ou mais xilanase é uma enzima de acordo com SEQ ID NO: 17 e/ou SEQ ID NO: 18, ou qualquer fragmento funcional das mesmas.

[0124] Em algumas realizações a combinação de uma enzima que exibe atividade endo-1,4- β -xilanase com uma enzima que exibe atividade de endo-1,3(4)- β -glicanase é de acordo com a tabela a seguir:

1ª enzima (Xilanase) 2ª enzima (Glicanase)	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

[0125] Entende-se que qualquer uma das combinações acima de uma 1ª enzima sendo uma enzima que exibe atividade de endo-1,4- β -xilanase pode ser combinada com uma enzima que exibe atividade de endo-1,3(4)- β -glicanase com uma razão entre as duas 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 ou 10:1, como em uma faixa de 1:10-10:1, como 2:10-10:2, como 3:10-10:3, como 4:10-10:4, como 5:10-10:5, como 6:10-10:6, como 7:10-10:7, como 8:10-10:8, ou dentro de 9:10-10:9.

[0126] Em algumas realizações, a composição de acordo com a invenção compreende uma combinação de pelo menos duas enzimas, cujas ditas duas enzimas, ou duas enzimas com uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 80% de identidade de sequência com a respectiva SEQ ID, ou qualquer fragmento funcional das mesmas, sendo selecionados a partir da lista que consiste em:

SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 7;
SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 7;
SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 7;
SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 7;
SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 7;
SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 7;
SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 7;
SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 7;
SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 8;
SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 8;
SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 8;
SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 8;
SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 8;
SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 8;
SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 8;
SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 8;
SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 9;
SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 9;

SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 9;
SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 9;
SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 9;
SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 9;
SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 9;
SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 9;
SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 10;
SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 10;
SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 10;
SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 10;
SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 10;
SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 10;
SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 10;
SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 10;
SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 11;
SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 11;
SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 11;
SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 11;
SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 11;
SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 11;
SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 11;
SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 11;
SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 12;
SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 12;
SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 12;
SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 12;
SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 12;
SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 12;

SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 12;
SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 12;
SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 13;
SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 13;
SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 13;
SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 13;
SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 13;
SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 13;
SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 13;
SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 13;
SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 14;
SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 14;
SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 14;
SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 14;
SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 14;
SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 14;
SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 14;
SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 14;
SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 15;
SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 15;
SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 15;
SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 15;
SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 15;
SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 15;
SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 15;
SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 15;
SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 16;
SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 16;

SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 16;

SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 16;

SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 16;

SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 16;

SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 16; e

SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 16.

[0127] Em algumas realizações, a atividade de endo-1,3(4)- β -glicanase e a atividade de endo-1,4- β -xilanase são derivadas de pelo menos duas enzimas diferentes, como pelo menos duas enzimas diferentes de duas espécies diferentes.

[0128] Em algumas realizações, a pressão total acumulada é reduzida para um valor menor que 470 mm WC, como menor que 450 mm WC, como menor que 430 mm WC, como menor que 410 mm WC, como menor que 390 mm WC, como menor que 370 mm WC, como menor que 350 mm WC, como menor que 330 mm WC, como menor que 310 mm WC, como menor que 300 mm WC, como menor que 290 mm WC, quando a composição de acordo com a presente invenção é usada antes da clarificação em uma aplicação de brassagem.

[0129] Em algumas realizações a pressão total acumulada é reduzida por pelo 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 ou 95%, em comparação ao uso de um controle negativo sem a dita composição; quando usada antes da clarificação em uma aplicação de brassagem.

[0130] Em algumas realizações, a filtrabilidade do mosto, conforme medida por volume de mosto coletado após 5 min de filtração em relação a um controle sem enzimas, é aumentada acima de 1,5, como cerca de 1,6, como cerca de 1,7, como cerca de 1,8, como cerca de 1,9, como cerca de

2,0, como cerca de 2,1, como cerca de 2,2, como cerca de 2,3, como cerca de 2,4, como cerca de 2,5, quando a composição de acordo com invenção é usada em uma aplicação de brassagem antes da separação do mosto.

[0131] Em algumas realizações, a filtrabilidade do mosto, conforme medida por volume de mosto coletado após 5 min de filtração é aumentada pelo 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 ou 300% em comparação ao uso de um controle negativo sem a dita composição.

[0132] Em algumas realizações, a composição de acordo com a invenção compreende qualquer uma ou mais enzimas adicionais. Em algumas realizações, uma ou mais enzimas são selecionadas a partir da lista que consiste em uma xilanase classificada como EC 3.2.1.32, EC 3.2.1.136 ou EC 3.2.1.156, uma celulase, uma laminarinase, uma endo-1,5- α -L-arabinanase, uma beta-D-glicosídeo-glicohidrolase, uma β -xilosidase, uma celobiohidrolase, uma glicano 1,4-beta-glicosidase, uma exo-beta-1,4-glicanase específica de xiloglicano e uma α -N-arabinofuranosidase.

[0133] As sequências e enzimas identificadas por uma sequência conforme mencionado no presente pedido e usadas de acordo com a presente invenção, sozinha ou em combinações com outras enzimas ou compostos, podem estar com ou sem peptídeo sinal.

ENSAIOS

MÉTODO DE ATIVIDADE DE CELULASE DNS (MÉTODO DNS CMC)

[0134] Nome sistemático: 1,4-(1,3;1,4)- β -D-glicano 4-glicanohidrolase

[0135] Número IUB: EC 3.2.1.4

PRINCÍPIO

[0136] O ensaio de celulase é baseado na endo-hidrólise

enzimática das ligações 1,4- β -D-glicosídicas em carboximetilcelulose (CMC), um β -1,4-glicano. Os produtos da reação (oligossacarídeos β -1,4 glicano) foram determinados colorimetricamente por medição do aumento resultante nos grupos redutores com o uso de um reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico. A atividade enzimática foi calculada a partir da relação entre a concentração de grupos redutores, como equivalentes de glicose, e absorbância a 540nm.

[0137] O ensaio foi realizado em pH 5,0, mas pode ser realizado em valores diferentes de pH para a caracterização adicional e especificação de enzimas.

DEFINIÇÃO DE UNIDADE

[0138] Uma unidade de atividade de celulase é definida como a quantidade de enzima que produz equivalente a 1 μ mol de glicose por minuto sob condições do ensaio (pH 5,0 (ou conforme especificado) e 50°C).

MATERIAIS

[0139] Carboximetilcelulose. Fornecedor: Megazyme Ltd. Product n°: CM-Celulose 4M

[0140] *D*-Glicose 'AnalaR'. Fornecedor: Merck Ltd (BDH). Produto n°: 10117. M.W.: 180,16

[0141] Acetato de sódio anidro "AnalaR". Fornecedor: Merck Ltd (BDH). Produto n°: 10236. M.W.: 82,03

[0142] Ácido acético ("glacial") "AnalaR". Fornecedor: Merck Ltd (BDH). Produto n°: 10001. M.W.: 60,05

[0143] Ácido 3,5-Dinitrosalicílico GPR (ácido 3,5-dinitro-2-hidroxibenzoico). Fornecedor: Merck Ltd (BDH). Produto n°: 28235

[0144] Péletes de hidróxido de sódio "AnalaR". Fornecedor: Merck Ltd (BDH). Produto n°: 10252. M.W.: 40,00

[0145] Tartarato de sódio e potássio (+)- "AnalaR". Fornecedor: Merck Ltd (BDH). Produto n°: 10219. M.W.: 282,22

[0146] Solução de carboximetilcelulose 1,5% (p/v) (CMC) em tampão acetato de sódio 0.1M, pH 5,0 (solução de substrato).

[0147] Solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). 20g/L de DNS em tampão contendo 32g/L de péletes de hidróxido de sódio, e 600 g/L de tartarato de sódio e potássio (+)-.

[0148] Solução de glicose padrão (0,50 mg/ml)

PROCEDIMENTO:

[0149] A composição de enzimas foi diluída em amostras e uma curva de glicose padrão, conforme mostrado na Figura 2, foi feito com o uso de concentrações de glicose de 0, 0,125, 0,25, 0,375 e 0,5 mg/ml.

[0150] 0,25 ml de solução de enzima foi misturada com 1,75 ml da solução de substrato (1,5% p/v) a 50°C e a reação foi interrompida após 10 min por adição de solução DNS. Isto é seguido por aquecimento a 95°C durante 5 minutos.

[0151] A densidade óptica das diferentes amostras foi medida a 540 nm (OD_{540nm}).

CÁLCULO

[0152] A atividade enzimática é determinada a partir da curva normal conforme mostrado na Figura 2.

[0153] A atividade é calculada como a seguir:

[0154] onde:

$$T = \Delta OD_{540nm} \text{ TESTE}$$

$$= OD_{540nm} \text{ TESTE} - OD_{540nm} \text{ BRANCO}$$

$$m = \text{gradiente da curva padrão (aproximadamente 1,0)}$$

c = eixo y intercepta a curva normal (sempre negativo e aproximadamente - 0,02)

$$180,16 \equiv \text{peso molecular de glicose}$$

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

A ≡ volume do ensaio em ml

V ≡ volume de enzima em ml

t ≡ tempo de ensaio em minutos

D = fator real de diluição de enzima (por exemplo, para 1,000g diluído para 1 litro $D = 1000$)

LAMINARINASE (MÉTODO DNS LAMINARINA)

PRINCÍPIO

[0155] A reação, catalisada por laminarinase, envolve a endohidrólise de ligações 1,3- glicosídicas em 1,3- β -D-glicanos. Os substratos incluem laminarina, paramilon e paquimano. Os produtos da reação (oligossacarídeos β -1,3-glicano) são determinados colorimetricamente por medição do aumento resultante nos grupos de redução com o uso de um reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico. A atividade enzimática é calculada a partir da relação entre a concentração de grupos redutores, como equivalentes de glicose, e absorbância a 540nm.

[0156] O ensaio foi realizado em pH 5,0 e 50°C, mas pode ser realizado em valores diferentes de pH e temperatura para a caracterização adicional e especificação de enzimas.

DEFINIÇÃO DE UNIDADE

[0157] Uma unidade de atividade de laminarinase é definida como a quantidade de enzima que produz equivalente a 1 μ mol de glicose por minuto sob condições do ensaio (pH 5,0 (ou conforme especificado)).

MATERIAIS

[0158] Veja materiais fornecidos acima para o ensaio de atividade de Celulase.

[0159] Laminarina (de *Laminaria digitata*). Fornecedor: Sigma-Aldrich Co. Ltda. Produto número: L 9634

[0160] Solução de laminarina 1,00% (solução p/v) (solução

substrato tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0).

[0161] 1,75 ml de solução de laminarina é misturada com 0,25 ml de solução enzimática diluída a 50°C durante 10 minutos e a reação interrompida por adição de 2 ml de solução de DNS.

[0162] A curva padrão foi feita com o uso de 0, 0,125, 0,25, 0,5 e 0,75 mg/ml de solução de glicose.

[0163] A densidade ótica foi medida a 540 nm (OD_{540nm}).

CÁLCULO

[0164] A atividade é calculada como a seguir onde:

$$T = \Delta OD_{540nm} \text{ TESTE}$$

$$= OD_{540nm} \text{ TESTE} - OD_{540nm} \text{ BRANCO}$$

m = gradiente da curva padrão (aproximadamente 1,0)

c = eixo y intercepta a curva normal (sempre negativo e aproximadamente - 0,03)

180.16 \equiv peso molecular de glicose

$10^3 \equiv$ para converter para μ moles

$A \equiv$ volume do ensaio em ml

$V \equiv$ volume de enzima em ml

$t \equiv$ tempo de ensaio em minutos

D = fator de diluição de enzima (por exemplo, para 1g diluído para 1 litro $D = 1000$)

ENSAIO DE ARABINASE

PRINCÍPIO

[0165] O ensaio de atividade de arabinase é baseado na determinação colorimétrica medindo por medição do aumento resultante nos grupos redutores com o uso de um reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico. A atividade enzimática foi calculada a partir da relação entre a concentração de grupos redutores, como equivalentes de arabinose, e absorbância a 540nm.

[0166] O ensaio foi realizado em pH 3,5, mas pode ser realizado

em valores diferentes de pH para a caracterização adicional e especificação de enzimas.

DEFINIÇÃO DE UNIDADE

[0167] Uma unidade de atividade de arabinose (Arabinanase (endo-1,5-alfa-L-arabinanase)) é definida como a quantidade de enzima que produz equivalente a 1 μ mol de arabinose por minuto sob condições do ensaio (pH 3,5 (ou conforme especificado) e 50°C).

MATERIAIS

[0168] Arabinana de açúcar de beterraba Megazyme

[0169] Arabinose Sigma A3131 M.W.: 150.1

[0170] Acetato de sódio anidro "AnalaR". Fornecedor: Merck Ltd (BDH). Produto nº: 10236. M.W.: 82.03

[0171] Ácido acético ("glacial") "AnalaR". Fornecedor: Merck Ltd (BDH). Produto nº: 10001. M.W.: 60.05

[0172] Ácido 3,5-Dinitrosalicílico GPR (ácido 3,5-dinitro-2-hidroxibenzoico). Fornecedor: Merck Ltd (BDH). Produto nº: 28235

[0173] Péletes de hidróxido de sódio "AnalaR". Fornecedor: Merck Ltd (BDH). Produto nº: 10252. M.W.: 40.00

[0174] Tartarato de sódio e potássio (+)- "AnalaR". Fornecedor: Merck Ltd (BDH). Produto nº: 10219. M.W.: 282.22

[0175] Solução de arabinana 1,5% (solução p/v) em tampão acetato de sódio 0.1M, pH 3,5 (solução substrato).

[0176] Solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). 20g/L de DNS em tampão contendo 32g/L de péletes de hidróxido de sódio, e 600 g/L de tartarato de sódio e potássio (+)-.

[0177] Solução de arabinose padrão (0,50 mg/ml)

PROCEDIMENTO:

[0178] A composição de enzimas foi diluída em amostras e uma curva de arabinose padrão foi feita com o uso de concentrações de arabinose

de 0, 0,125, 0,25, 0,375 e 0,5 mg/ml.

[0179] 0,25 ml de solução de enzima foi misturada com 1,75 ml da solução de substrato (1,5% p/v) a 50°C e a reação foi interrompida após 10 min por adição de solução DNS. Seguido por aquecimento a 95°C durante 5 minutos.

[0180] A densidade óptica das diferentes amostras foi medida a 540 nm (OD_{540nm}).

CÁLCULO

[0181] A atividade enzimática é determinada a partir da curva padrão.

[0182] A atividade é calculada como a seguir onde:

$$T = \Delta OD_{540nm} \text{ TESTE}$$

$$= OD_{540nm} \text{ TESTE} - OD_{540nm} \text{ BRANCO}$$

m = gradiente da curva padrão (aproximadamente 1,0)

c = eixo y intercepta a curva normal (sempre negativo e aproximadamente - 0,02)

150.13 \equiv peso molecular de arabinose

$10^3 \equiv$ para converter para μ moles

$A \equiv$ volume do ensaio em ml

$V \equiv$ volume de enzima em ml

$t \equiv$ tempo de ensaio em minutos

D = fator real de diluição de enzima (por exemplo, para 1,000g diluído para 1 litro $D = 1000$)

ENSAIO DE ARABINOFURANOSIDASE

[0183] A reação, catalisada por α -N-arabinofuranosidase, envolve a hidrólise da ligação terminal, no resíduo α -L-arabinofuranosídeo não redutor, de α -L-arabinosídeos. A enzima age sobre α -L-arabinofuranosídeos, α -L-arabinanas contendo ligações (1,3) e/ou (1,5), arabinoxilanas e

arabinogalactanas.

[0184] O ensaio de α -N-arabinofuranosidase é baseado na hidrólise enzimática de p-nitrofenil α -L-arabinofuranosídeo. O ensaio é um método de “dois pontos”, ao invés de um “monitoramento contínuo”. O cálculo de atividade enzimática é baseado nas medições tomadas só no início e no final do período de incubação. Um produto da reação, p-nitrofenol é determinado colorimetricamente (após ajuste de pH). A atividade enzimática é calculada a partir da relação entre a concentração de p-nitrofenol e absorvância a 400nm.

PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO DE ENZIMA DILUÍDA

[0185] Preparar todas as soluções de enzima, a partir de pó ou preparações líquidas de enzima, com vidro com água destilada. Minimizar os erros de diluição do ensaio evitando etapas de grandes diluições envolvendo volumes ou pesos pequenos. Ao fazer diluições de enzima é mais exato, mesmo para uma amostra líquida, pesar a amostra inicial de enzima. Se isto é feito, no caso de amostras líquidas é, portanto, necessário medir a gravidade específica do líquido a 20°C

[0186] Como o ensaio é um método de “dois pontos”, ao invés de um “monitoramento contínuo”, é importante garantir a linearidade dentro do período de incubação com sistemas e condições diferentes de enzima. Sob as condições padrão de ensaio de concentração de substrato, pH, temperatura e tempo de ensaio, o ensaio demonstrou ser linear na faixa de ΔOD_{540nm} TESTE (T) = 0,20 – 1,50. No entanto, para boa prática, o ensaio é operado dentro de uma faixa definida de ΔOD_{540nm} TESTE (T) = 0,400 a 0,800.

PROCEDIMENTO:

[0187] Cada ensaio de amostra de enzima envolve três análises: Análise de teste duplicado (TESTE) e uma análise de branco (BLANK). O procedimento fornecido descreve a análise de uma única amostra de enzima.

	TESTE	BRANCO
Tampão acetato de sódio 0,2M, pH 5,0	1,00 mL	1,00 mL
Água destilada em vidro	1,00 mL	1,00 mL
solução de <i>p</i> -nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo	1,00 mL	1,00 mL

[0188] 0,25 ml de solução de enzima diluída foi adicionada às soluções a 50°C, a reação foi interrompida após 10 minutos por adição de 4 ml de solução de glycine 0,4M, pH 10,8 (reagente de parada).

[0189] A absorvância foi medida a 400 nm a 25°C em relação à água com branco (*blank*).

- determinar OD_{400nm} TESTE para os TESTES duplicados medidos;

- determinar OD_{400nm} de branco (BLANK).

CÁLCULO

[0190] onde: $T = OD_{400nm} \text{ TESTE} - OD_{400nm} \text{ branco}$

18300 = coeficiente de extinção molar para *p*-nitrofenol (1 comprimento de extensão de trajetória de 1 cm)

$V = 7,25$ (volume líquido total em teste em ml)

$t = 10$ (minutos)

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

$E = 0,25$ (volume de amostra de enzima diluída em ml)

$D =$ fator de diluição de enzima, por exemplo, para 1 ml diluído para 1 litro $D = 1000$)

ENSAIO DE CELOBIOHIDROLASE

PRINCÍPIO

[0191] A reação, catalisada por celobiohidrolase, envolve a hidrólise de ligações 1,4- β -D-glicosídicas em celulose e celotetraose, liberando celobiose das extremidades não redutoras das cadeias.

[0192] O ensaio de celobiohidrolase é baseado na hidrólise enzimática de p-nitrofenil β -D-celobiopiranosídeo. O produto da reação, p-nitrofenol é determinado colorimetricamente (após ajuste de pH). A atividade enzimática é calculada a partir da relação entre a concentração de p-nitrofenol e absorvância a 400nm.

[0193] O ensaio é operado dentro da faixa linear definida de ΔOD_{540nm} TESTE (T) = 0,400 a 0,800.

PROCEDIMENTO:

[0194] Cada ensaio de amostra de enzima envolve três análises: Análise de teste duplicado (TESTE) e uma análise de branco (*BLANK*). O procedimento fornecido descreve a análise de uma única amostra de enzima.

	TESTE	BRANCO (<i>BLANK</i>)
Tampão acetato de sódio 0,2M, pH 5,0	1,00 mL	1,00 mL
Água destilada em vidro	1,00 mL	1,00 mL
solução de p-Nitrofenil- β -D-celobiopiranosídeo	1,00 mL	1,00 mL

[0195] 0,25 ml de solução de enzima diluída foi adicionada à solução de teste a 50°C, após 30 minutos, 4 ml de solução de glicina 0,4M, pH 10,8 (reagente de parada) foi adicionado a cada tubo.

[0196] A absorvância foi medida a 20°C em 400 nm em um cadinho de vidro de 1cm em relação à água com branco.

- determinar OD_{400nm} TESTE para os TESTES duplicados medidos;
- determinar OD_{400nm} de branco (*BLANK*).

CÁLCULO

[0197] onde: T = OD_{400nm} TESTE – OD_{400nm} branco

18300 = coeficiente de extinção molar para p-nitrofenol (1 comprimento de extensão de trajetória de 1 cm)

$V = 7,25$ (volume líquido total em teste em ml)

1000 = para converter para litros

10^6 = para converter para μ moles

$t = 30$ (minutos)

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

$E = 0,25$ (volume de amostra de enzima diluída em ml)

D = fator de diluição de enzima, por exemplo, para 1 ml diluído para 1 litro $D = 1000$)

REALIZAÇÕES NUMERADAS DE ACORDO COM A INVENÇÃO

[0198] 1. Enzima, que exibe atividade de endo-1,4- β -xilanase, cuja enzima compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 80% de identidade com qualquer uma selecionada a partir 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 e SEQ ID NO: 18, ou qualquer fragmento funcional das mesma.

[0199] 2. Enzima, de acordo com a realização 1, cuja enzima tem uma razão na atividade entre substrato arabinóxilano solúvel (WE-AX) e substrato arabinóxilano insolúvel (WU-AX) menor que cerca de 7,0, como menor que cerca de 6,5, como menor que cerca de 6,0, como menor que cerca de 5,5, como menor que cerca de 5,0, como menor que cerca de 4,5.

[0200] 3. Enzima, que exibe atividade de endo-1,3(4)- β -glicanase, cuja enzima compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 80% de identidade com qualquer uma selecionada a partir de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, ou qualquer fragmento funcional das mesmas.

[0201] 4. Enzima, de acordo com qualquer uma das realizações 1 a 3, cuja enzima tem uma temperatura ótima na faixa de 40 a 70°C, como na faixa de 45 a 65°C, como na faixa de 50 a 65°C, como na faixa

de 55 a 65°C.

[0202] 5. Enzima, de acordo com qualquer uma das realizações 1 a 4, cuja dita enzima tem pelo menos 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99% de identidade com qualquer sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NO: 1 a 18, ou qualquer fragmento funcional das mesmas.

[0203] 6. Enzima, de acordo com qualquer uma das realizações 1 a 5, que tem um número total de aminoácidos menor que 350, como menor que 340, como menor que 330, como menor que 320, como menor que 310, como menor que 300 aminoácidos, como na faixa de 200 a 350, como na faixa de 220 a 345 aminoácidos.

[0204] 7. Enzima, de acordo com qualquer uma das realizações 1 a 6, em que a sequência de aminoácidos da dita enzima tem pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove ou dez substituições de aminoácidos, em comparação com qualquer sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NO: 1 a 18, ou qualquer fragmento funcional das mesmas.

[0205] 8. Enzima, de acordo com qualquer uma das realizações 1 a 7, em que a sequência de aminoácidos da dita enzima tem no máximo uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove ou dez substituições de aminoácidos, em comparação com qualquer sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NO: 1 a 18, ou qualquer fragmento funcional das mesmas.

[0206] 9. Enzima, de acordo com qualquer uma das realizações 1 a 8, cuja enzima compreende a sequência de aminoácido identificada por qualquer um de identificação DE SEQ NÃO: 1 a 18, ou qualquer fragmento funcional das mesmas.

[0207] 10. Enzima, de acordo com qualquer uma das

realizações 1 ou 3, cuja enzima consiste na sequência de aminoácidos identificada por qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 18, ou qualquer fragmento funcional das mesmas.

[0208] 11. Construção de DNA, que compreende uma sequência de DNA que codifica uma enzima de acordo com qualquer uma das realizações 1 a 10.

[0209] 12. Vetor de expressão recombinante, que compreende uma construção de DNA para a realização 11.

[0210] 13. Célula, que foi transformada com uma construção de DNA da realização 11, ou com o vetor da realização 12.

[0211] 14. Preparação, que compreende uma enzima, de acordo com qualquer uma das realizações 1 a 10, ou uma construção de DNA de acordo com a realização 11, ou um vetor de acordo com a realização 12, ou uma célula de acordo com a realização 13.

[0212] 15. Composição, que compreende uma enzima que exibe atividade de endo-1,4- β -xilânase, de acordo com qualquer uma das realizações 1, 2, 4 a 10, em combinação com qualquer uma ou mais β -glicanases.

[0213] 16. Composição, de acordo com a realização 15, em que a dita uma ou mais β -glicanases é uma enzima que exibe atividade de endo-1,3(4)- β -glicanase, de acordo com qualquer uma das realizações 3 a 10.

[0214] 17. Composição, que compreende uma enzima que exibe atividade de endo-1,3(4)- β -glicanase, de acordo com qualquer uma das realizações 3 a 10, em combinação com qualquer uma ou mais xilânases.

[0215] 18. Composição, de acordo com a realização 17, em que a dita uma ou mais xilânases é uma enzima que exibe atividade de endo-1,4- β -xilânase, de acordo com qualquer uma das realizações 1, 2, 4 a 10.

[0216] 19. Composição, de acordo com qualquer uma das

realizações 15 a 18, em que a dita atividade de endo-1,3(4)- β -glicanase e a dita atividade de endo-1,4- β -xilanase são derivadas de pelo menos duas enzimas diferentes, como pelo menos duas enzimas diferentes de duas espécies diferentes.

[0217]20. Composição, de acordo com qualquer uma das realizações 15 a 19, que compreende uma combinação de pelo menos duas enzimas, cujas ditas duas enzimas, ou duas enzimas com uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 80% de identidade de sequência com a respectiva SEQ ID, ou qualquer fragmento funcional das mesmas, sendo selecionados a partir da lista que consiste em:

- SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 7;
- SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 7;
- SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 7;
- SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 7;
- SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 7;
- SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 7;
- SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 7;
- SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 7;
- SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 8;
- SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 8;
- SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 8;
- SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 8;
- SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 8;
- SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 8;
- SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 8;
- SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 8;
- SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 9;
- SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 9;

SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 9;
SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 9;
SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 9;
SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 9;
SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 9;
SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 9;
SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 10;
SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 10;
SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 10;
SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 10;
SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 10;
SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 10;
SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 10;
SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 10;
SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 11;
SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 11;
SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 11;
SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 11;
SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 11;
SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 11;
SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 11;
SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 11;
SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 12;
SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 12;
SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 12;
SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 12;
SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 12;
SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 12;

SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 12;
SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 12;
SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 13;
SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 13;
SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 13;
SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 13;
SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 13;
SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 13;
SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 13;
SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 13;
SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 14;
SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 14;
SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 14;
SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 14;
SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 14;
SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 14;
SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 14;
SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 14;
SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 15;
SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 15;
SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 15;
SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 15;
SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 15;
SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 15;
SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 15;
SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 15;
SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 16;
SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 16;

SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 16;

SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 16;

SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 16;

SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 16;

SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 16; e

SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 16.

[0218] 21. Composição, de acordo com qualquer uma das realizações 15 a 20, em que quando usada antes da clarificação em uma aplicação de brassagem, a pressão total acumulada é reduzida para um valor menor que 470 mm WC, como menor que 450 mm WC, como menor que 430 mm WC, como menor que 410 mm WC, como menor que 390 mm WC, como menor que 370 mm WC, como menor que 350 mm WC, como menor que 330 mm WC, como menor que 310 mm WC, como menor que 300 mm WC, como menor que 290 mm WC.

[0219] 22. A composição de acordo com qualquer uma das realizações 15 a 21, em que quando usada antes da clarificação em uma aplicação de brassagem, a pressão total acumulada é reduzida por pelo 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 ou 95%, em comparação ao uso de um controle negativo sem a dita composição.

[0220] 23. Composição, de acordo com qualquer uma das realizações 15 a 22, em que quando usada em uma aplicação de brassagem antes da separação do mosto, a filtrabilidade do mosto, conforme medida por volume de mosto coletado após 5 min de filtração em relação a um controle sem enzimas, é aumentada acima de 1,5, como cerca de 1,6, como cerca de 1,7, como cerca de 1,8, como cerca de 1,9, como cerca de 2,0, como cerca de 2,1, como cerca de 2,2, como cerca de 2,3, como cerca de 2,4, como cerca de

2,5.

[0221] 24. Composição, de acordo com qualquer uma das realizações 15 a 23, quando usada em uma aplicação de brassagem antes da separação do mosto, a filtrabilidade do mosto, conforme medida por volume de mosto coletado após 5 min de filtração, é aumentada pelo 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 ou 300%, em comparação ao uso de um controle negativo sem a dita composição.

[0222] 25. Composição, de acordo com qualquer uma das realizações 15 a 24, que compreende qualquer uma ou mais enzimas.

[0223] 26. Composição, de acordo com a realização 25, em que as ditas uma ou mais enzimas são selecionadas a partir da lista que consiste em uma xilanase classificada como EC 3.2.1.32, EC 3.2.1.136 ou EC 3.2.1.156, uma celulase, uma laminarinase, uma endo-1,5- α -L-arabinanase, uma beta-D-glicosídeo-glicohidrolase, uma β -xilosidase, uma celobiohidrolase, uma glicano 1,4-beta-glicosidase, uma exo-beta-1,4-glicanase específica de xiloglicano e uma α -N-arabinofuranosidase.

[0224] 27. Uso, de uma enzima de acordo com as realizações 1 a 10, ou de uma preparação de acordo com a realização 14, ou de uma composição de acordo com qualquer uma das realizações 15 a 26, na produção de um alimento, ração ou produto de bebida de malte.

[0225] 28. Uso, de uma enzima de acordo com as realizações 1 a 10, ou uma preparação de acordo com a realização 14, ou de uma composição de acordo com qualquer uma das realizações 15 a 26, na produção de massa ou produtos assados.

[0226] 29. Uso, de uma enzima de acordo com as realizações 1

a 10, ou uma preparação de acordo com a realização 14, ou de uma composição de acordo com qualquer uma das realizações 15 a 26, na produção de polpa ou papel.

[0227] 30. Uso, de uma enzima de acordo com as realizações 1 a 10, ou uma preparação de acordo com a realização 14, ou de uma composição de acordo com qualquer uma das realizações 15 a 26, para produção de componentes cereais.

[0228] 31. Uso, de acordo com a realização 29, em que o cereal é centeio, trigo ou cevada.

[0229] 32. Uso, de enzima de acordo com as realizações 1 a 10, ou de uma preparação de acordo com a realização 14, ou de uma composição de acordo com qualquer uma das realizações 15 a 26, na produção de cerveja ou modificação de subprodutos a partir de um processo de brassagem.

[0230] 33. Uso, de enzima de acordo com as realizações 1 a 10, ou de uma preparação de acordo com a realização 14, ou de uma composição de acordo com qualquer uma das realizações 15 a 26, na produção de vinho ou suco.

[0231] 34. Uso, de enzima de acordo com as realizações 1 a 10, ou uma preparação de acordo com a realização 14, ou de uma composição de acordo com qualquer uma das realizações 15 a 26, na produção de um biocombustível de primeira ou de segunda geração, como bioetanol.

[0232] 35. Método, de alteração da filtrabilidade de um material que compreende amido, cujo dito método compreende a etapa de tratamento do dito material que compreende amido, com enzima, de acordo com as realizações 1 a 10, ou com uma preparação de acordo com a realização 14, ou com uma composição de acordo com qualquer uma das realizações 15 a 26.

[0233] 36. Método, de redução da pressão acumulada durante

a clarificação em uma aplicação de brassagem, cujo dito método compreende a etapa de tratamento de uma pasta de brassagem com enzima, de acordo com as realizações 1 a 10, ou com uma preparação de acordo com a realização 14, ou com uma composição de acordo com qualquer uma das realizações 15 a 26.

[0234] 37. Método, para a produção de um alimento, ração ou produto de bebida, como uma bebida alcoólica ou não alcoólica, como uma bebida à base de cereal ou malte como cerveja ou uísque, cujo dito método compreende a etapa de tratamento de um material que compreende amido, com enzima, de acordo com as realizações 1 a 10, ou com uma preparação de acordo com a realização 14, ou com uma composição de acordo com qualquer uma das realizações 15 a 26.

[0235] 38. Método, para a produção de uma pasta de brassagem, cujo dito método compreende a etapa de tratamento de um material que compreende amido, com enzima, de acordo com as realizações 1 a 10, ou com uma preparação de acordo com a realização 14, ou com uma composição de acordo com qualquer uma das realizações 15 a 26.

[0236] 39. Método, para a produção de um biocombustível de primeira ou de segunda geração, como bioetanol, cujo dito método compreende a etapa de tratamento de um material que compreende amido, com uma enzima, de acordo com as realizações 1 a 10, ou com uma preparação de acordo com a realização 14, ou com uma composição de acordo com qualquer uma das realizações 15 a 26.

[0237] 40. Produto, obtido pelo método de acordo com qualquer uma das realizações 38 a 39.

[0238] 41. Composição, que compreendem o produto de acordo com a realização 40, como em que o produto está em uma faixa de 0,1% a 99,9%.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

[0239] Métodos e resultados em relação ao depósito de xilanases/glicanases para aplicação de brassagem.

[0240] Os métodos abaixo foram usados para selecionar xilanases e glicanases com aplicação em brassagem:

MÉTODOS

MÉTODO DA XILANASE EM ARABINOXILANO EXTRAÍVEL COM ÁGUA (WE-AX)

[0241] As amostras, para obter aproximadamente $OD_{540} = 0.25 - 0.30$ nesse ensaio, e os padrões de xilose (0; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,500 mg/mL de água destilada) são preparados em água destilada. No tempo $t=0$ min, 1,75 mL de arabinóxilano no trigo solúvel (0,5% arabinóxilano no trigo (PWAXYH, Megazyme, Bray, Irlanda)) em acetato de sódio/ácido acético 0,1 M, pH 5) é adicionado a um tubo de ensaio a 50°C. No tempo $t=5$ min, 250 μ L de solução enzimática são adicionados ao substrato a 50°C, seguido por mistura. Água destilada é usada como branco. No tempo $t=15$ min, 2 mL de solução DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) 1%, hidróxido de sódio 1,6%, tartarato de sódio de potássio 30% em água destilada) são adicionados à solução enzima-substrato e a 2 mL de solução padrão. As amostras, brancos e padrões são colocados em banho-maria (95°C) por 5 min. Em seguida, as amostras, brancos e padrões são resfriados em banho-maria a 25°C por 20 min. A densidade ótica de todas as amostras são lidas a OD_{540} com o uso de um espectrofotômetro. Com base na diluição das amostras, quantidade de amostra utilizada e padrões, a atividade de xilanase nas amostras pode ser calculada.

[0242] Uma unidade de atividade de endo-1,4- β -xilanase de WE-AX é definida como a quantidade de enzima que produz 1 μ M de equivalentes de xilose por min sob as condições mencionadas acima (método da xilanase em arabinóxilano água extraível (WE-AX)).

MÉTODO DA XILANASE EM ARABINOXILANO NÃO-EXTRAÍVEL EM ÁGUA (WU-AX)

[0243] As amostras são preparadas em água destilada. No tempo $t=0$ min, 1,75 mL de arabinosilano no trigo insolúvel (0,5% arabinosilano no trigo (PWAXYI, Megazyme, Bray, Irlanda)) em acetato de sódio/ácido acético 0,1 M, pH 5) é adicionado a um tubo de ensaio a 50°C. No tempo $t=5$ min, 250 μ L de solução enzimática são adicionados ao substrato a 50°C, seguido por mistura. Água destilada é usada como branco. No tempo $t=15$ min, as amostras e brancos são colocados em banho-maria (95°C) por 5 min. Em seguida, as amostras e brancos são centrifugados para precipitar o substrato insolúvel residual. A quantidade de arabinosilano em solução é determinada com o uso do método descrito por Rouau, X. e Surget, A. (1994), *Carbohydrate Polymers*, 24, 123-132.

[0244] A atividade da endo-1,4- β -xilanasase de WU-AX é definida como a quantidade de pentoses solubilizadas (μ g de pentose) sob as condições descritas acima, obtendo a definição de unidade de μ g de pentose/g de amostra de xilanasase.

ENSAIO DA ATIVIDADE DE XILANASE

[0245] As amostras, para obter aproximadamente OD₅₄₀ = 0,25 – 0,30 nesse ensaio, e os padrões de xilose (0; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,500 mg/mL de água destilada) são preparados em água destilada. No tempo $t=0$ min, 1,75 mL de arabinosilano no trigo solúvel (0,5% arabinosilano no trigo (PWAXYH, Megazyme, Bray, Irlanda)) em acetato de sódio/ácido acético 0,1 M, pH 5) é adicionado a um tubo de ensaio a 50°C. No tempo $t=5$ min, 250 μ L de solução enzimática são adicionados ao substrato a 50°C, seguido por mistura. Água destilada é usada como branco. No tempo $t=15$ min, 2 mL de solução DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) 1%, hidróxido de sódio 1,6%, tartarato de sódio de potássio 30% em água destilada) são adicionados à solução enzima-substrato e a 2 mL de solução padrão. As amostras, brancos e

padrões são colocados em banho-maria (95°C) por 5 min. Em seguida, as amostras, brancos e padrões são resfriados em banho-maria a 25°C por 20 min. A densidade ótica de todas as amostras são lidas a OD₅₄₀ com o uso de um espectrofotômetro. Com base na diluição das amostras, quantidade de amostra utilizada e padrões, a atividade de xilanase nas amostras pode ser calculada.

[0246] Uma unidade de atividade de endo-1,4-β-xilanase WE-AX é definida como a quantidade de enzima que produz 1 μM de equivalentes de xilose por min sob as condições mencionadas acima.

ENSAIO DA ATIVIDADE DE GLICANASE

[0247] As amostras, para obter aproximadamente OD₅₄₀ dentro da curva padrão nesse ensaio, e os padrões de glicose (0; 0,125; 0,250; 0,500 e 0,750 mg/mL de água destilada) são preparados em água destilada. No tempo t=0 min, 1,75 mL de β-glicana de cevada (β-glicana de cevada 1,5% (P-BGBM, Megazyme, Bray, Irlanda)) em acetato de sódio/ácido acético 0,1 M, pH 5) é adicionado a um tubo de ensaio a 50°C. No tempo t=5 min, 250 μL de solução enzimática são adicionados ao substrato a 50°C, seguido por mistura. Água destilada é usada como branco. No tempo t=15 min, 2 mL de solução DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) 1%, hidróxido de sódio 1,6%, tartarato de sódio de potássio 30% em água destilada) são adicionados à solução enzima-substrato e a 2 ml de solução padrão. As amostras, brancos e padrões com adição de DNS são colocados em banho-maria (95°C) por 15 min. Em seguida, as amostras, brancos e padrões são resfriados em banho-maria a 25°C por 20 min. A densidade ótica de todas as amostras são lidas a OD₅₄₀ com o uso de um espectrofotômetro. Com base na diluição das amostras, quantidade de amostra utilizada e padrões, a atividade de glicanase nas amostras pode ser calculada.

[0248] Uma unidade de atividade de endo-1,3-β-glicanase é

definida como a quantidade de enzima que produz 1 μ M de equivalentes de glicose por min sob as condições do ensaio (pH 5,0 (ou como especificado) e 50°C).

MÉTODO DE APLICAÇÃO DE BRASSAGEM EM ESCALA LABORATORIAL

[0249] Os estudos de aplicação de brassagem em escala laboratorial foram realizados com o uso de malte pilsner:cevada em uma razão 75:25 a uma razão água:grist de 3:1 (150 ml:50 g de grist). Inicialmente, a água foi pré-aquecida a 53°C antes da maceração e ajuste do pH (5,4, H₂SO₄ 2 M). Após atingida a temperatura inicial (período de 10 min), o perfil de maceração (consulte Figura 1) é iniciado e as enzimas são adicionadas. Após a maceração, a separação do mosto é realizada com o uso de um funil plástico convencional e filtro de papel (filtro de papel No. 1,24 cm de diâmetro, Whatman, Inglaterra). O desempenho da filtração foi avaliado, assim como vários outros parâmetros do mosto, como, por exemplo, viscosidade, β -glicana e pentosana.

[0250] A filtração do mosto foi medida por 30 min, após a qual a filtração foi terminada. O mosto coletado foi resfriado antes de qualquer análise adicional.

FILTRAÇÃO

[0251] Os dados de filtração são apresentados como volume de mosto coletado após 5, 10, 15 e 30 min em relação ao branco (brassagem sem enzimas exógenas adicionadas).

BRASSAGEM EM ESCALA PILOTO

[0252] Os ensaios foram realizados em uma instalação de brassagem em escala piloto (capacidade de 2 HL). A separação de mosto foi realizada por clarificação e filtração da cerveja por filtração em kieselguhr horizontal.

[0253] Para elucidar a otimização da filtração por combinação de glicanase e xilanase sob condições de brassagem rigorosas, os ensaios de

brassagem em escala piloto foram realizados com o uso de grist misturado compreendendo 75% malte e 25% cevada. Inicialmente, a razão água:grist foi estabelecida em 2,8:1 (início da maceração) aumentado para 3,1:1 no início da clarificação. Em comparação, as razões água:grist de cerca de 3,2 a 3,8 são típicas na clarificação de instalações de brassagem em grande escala. Dessa forma, acredita-se que os parâmetros do ensaio piloto atual de razão água:grist 3,1:1 estão no final rigoroso da escala.

[0254] Malte e cevada foram moídos secos com o uso de um moinho de dois rolos. Tanto cevada como malte foram moídos duas vezes com o uso de uma distância de rolamento de aproximadamente 0,7 mm.

[0255] A maceração-*in* foi realizada objetivando uma temperatura inicial de maceração de 53°C. Após pequenos ajustes na maceração-*in* serem realizados, como: ajuste do volume da pasta para a razão água:grist de 2,8:1 e ajuste do pH para aproximadamente 5,56 (ácido láctico). Após o ajuste fino da pasta, a enzima foi adicionada e o perfil de maceração dado na Figura 1 foi seguido. O descanso da sacarificação a 70°C foi programado para 15 min, no entanto, o período de descanso foi estendido por 5 min até o teste de iodina não mostrar a presença de amido (Ludwig Narziss e Werner Back, Technische Universitaet Muenchen (Fakultaet fuer Brauwesen, Weihenstephan), Abriss der Bierbrauerei. WILEY-VCH Verlags GmbH Weinheim Germany, 2005).

[0256] A maceração-*off* foi iniciada após um descanso de 5 min a 78°C. A pasta foi transferida para Lauter Tun, que foi previamente preenchido com água para uma altura imediatamente abaixo do “fundo falso”. A pasta descansou por 5 min para a decantação do bolo de filtro. Isso foi seguido por uma recirculação de 15 min (140 L/h) garantindo a decantação do bolo de filtro e clarificação do mosto. Tipicamente em brassagem em grande escala, a filtração será iniciada quando uma dada turvação de mosto for obtida, no

entanto, nos presentes ensaios, a recirculação foi mantida constante a 15 min, permitindo a comparação dos ensaios. Durante a clarificação, os dados a seguir foram coletados, incluindo tempo (min), volume de mosto coletado (L), diferença de pressão de filtração ao longo do bolo de filtro (mmWC, mm de coluna de água), capacidade de bomba (%), turvação do mosto (EBC) e temperatura da pasta (°C).

[0257] Acredita-se que o aumento da pressão acumulada ao longo do bolo de filtro durante a filtração seja um fator que contribui para estabelecer o padrão de desempenho da clarificação do mosto. A obtenção de diferenças muito altas de pressão – por exemplo, 250 mmWC durante a primeira coleta de mosto e, por exemplo, 450 mmWC para o remanescente da clarificação – maturação do bolo de filtro (também chamada de corte profundo) é induzida. A maturação é um processo no qual um bolo de filtro colapsa ou uma formação de canal de filtração é aliviada pela desaceleração do corte do bolo de filtro com facas especialmente projetadas. Após a maturação do bolo de filtro, uma recirculação de 6 min do mosto (taxa de fluxo: 120 L/h) foi introduzida preparando o bolo de filtro para a filtração continuada. A maturação do bolo de filtro alivia um desempenho de filtração, de outra maneira comprometida, que também resultaria em baixa qualidade de mosto. Se nenhuma maturação induzido por pressão fosse introduzida no início da terceira homogeneização, as maturações automáticas seriam realizadas no início da terceira e quarta homogeneizações para garantir que nenhum bloco inteiro de filtração se formasse imediatamente antes do término da separação do mosto.

[0258] A clarificação foi realizada com as configurações ilustradas na Tabela 1.

TABELA 1
CONFIGURAÇÕES DA CLARIFICAÇÃO
VOLUMES COLETADOS (L), FLUXO DE FILTRAÇÃO (L/H) E VOLUMES DE
HOMOGENEIZAÇÕES (L)

Mosto	Volume coletado, L	Fluxo de Filtração, L/h	Volume de Aspersão, L
Primeiro mosto	0 a 60	130	
1ª aspersão	60 a 78	140	18
2ª aspersão	78 a 96	160	18
3ª aspersão	96 a 114	180	18
4ª aspersão	114 a 140	180	26

[0259] Após o término da clarificação, o mosto doce foi devolvido ao Tonel de Pasta, aquecido até fervura e lúpulo foi adicionado. A lupagem foi continuada por 80 min e, ao final da lupagem, o pH é ajustado para $5,10 \pm 0,05$. O lúpulo foi removido a partir do mosto amargo pelo uso de uma centrifugadora e, em seguida, o mosto foi resfriado a aproximadamente 8°C. Para a fermentação, uma levedura seca de fermentação de fundo (*Saccharomyces cerevisiae*) W34/70 adquirida junto à Fermentis foi escolhida. A levedura foi reidratada por 30 min e inoculada a 100 g/HL. A fermentação principal foi mantida por 5 a 6 dias a 10°C, seguido por maturação a 15°C até atenuação e com diacetil abaixo de 80 ppb. A cerveja foi armazenada por outras 2 a 3 semanas a 1°C e 0,7 bar antes da filtração.

[0260] A cerveja foi filtrada horizontalmente pelo uso de placas de vela de 1,2 µm PP e kieselguhr. Até 8 placas poderiam ser incluídas na unidade de filtração, resultando em uma área total de filtração de aproximadamente 0,5 m². Nos presentes estudos, 3 placas foram incluídas e a

filtração foi realizada a uma taxa de fluxo de 130 L/h, resultando em uma velocidade de filtração de 6,9 HL/(h·m²). Em cervejarias de grande escala, a velocidade de filtração é geralmente estabelecida entre 5 a 7 HL/(h·m²). Dessa forma, é óbvio que as configurações presentes estão no limite superior – uma escolha intencional que desafia as condições de filtração da cerveja para verificar os potenciais benefícios da escolha de usar uma enzima no processo de brassagem. Durante a filtração da cerveja, as taxas de fluxo (L/h), assim como os valores de pressão (*P-in* e *P-out*) foram monitorados para verificar o desempenho da filtração da cerveja. Além disso, um número de análises da cerveja, como Gravidade Original (OG), Extrato Aparente (AE), Álcool por Volume (ABV), Grau Aparente de Fermentação (ADF), Grau Real de Fermentação (RDF), pH, cor e amargor foram realizados para a avaliação da qualidade da cerveja.

RESULTADOS

XILANASES

[0261] As xilanases foram selecionadas quanto às suas atividades em substrato solúvel e insolúvel e características de pH e de temperatura. Os resultados são mostrados na Tabela 2.

TABELA 2

XILANASES SELECIONADAS, SUAS ATIVIDADES EM SUBSTRATO DE ARABINOXILANO SOLÚVEL (WE-AX) E INSOLÚVEL (WU-AX) E SUAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS EM RELAÇÃO À TEMPERATURA E PH

Nome	Origem	GH	WE-AX	WU-AX	WU-AX/WE-AX	Temperatura ótima, °C	T ^{1/2} temp, °C	pH ótimo
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

Nome	Origem	GH	WE-AX	WU-AX	WU-AX/WE-AX	Temperatura ótima, °C	T _{1/2} temp, °C	pH ótimo
BsuXyn3	<i>Bacillus subtilis</i> , BS3	11	82	1095357	13388	50	n.d.	6
BsuXyn4	<i>Bacillus subtilis</i> , BS4 #160	11	54	1005400	18619	50	n.d.	6
TerXyn1	<i>Geosmithia emersonii</i>	10	1467	6208786	4232	78	>78	3
AtuXyn3	<i>Aspergillus tubigenensis</i>	10	1220	7760982	6361	65	67	4.5
AtuXyn4	<i>Aspergillus tubigenensis</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. = Não determinado								

[0262] As atividades enzimáticas de WE-AX e WU-AX (U) foram medidas conforme descrito nas seções “método da xilanase em arabinóxilano extraível em água (WE-AX)” e “método da xilanase em arabinóxilano não extraível em água (WU-AX)”.

[0263] Com base nos resultados da triagem bioquímica, as xilanases com uma razão de atividade adequada em arabinóxilano solúvel vs. insolúvel foram escolhidas para testes adicionais em ensaios de aplicação. Os resultados são mostrados na Tabela 3.

TABELA 3

XILANASES SELECIONADAS E A PRODUÇÃO RELATIVA DE EXTRATO OBTIDO COM O USO DE XILANASES VERSUS BRANCO (SEM XILANASES)

[0264] Finalmente, a especificidade do substrato de xilanases é ilustrada como uma razão de sua atividade em arabinóxilano insolúvel vs. solúvel (WU-AX/WE-AX).

Desempenho de Filtração						
Nome	Origem	5 min	10 min	15 min	30 min	WU-AX/WE-AX
Branco		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 #160	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	18619
TerXyn1	<i>Geosmithia emersonii</i> (<i>Taleromyces emersonii</i>)	2,19	1,92	1,70	1,44	4232
AtuXyn3	<i>Aspergillus tubigensis</i>	2,06	1,75	1,59	1,37	6361
AtuXyn4	<i>Aspergillus tubigensis</i>	1,02	1,01	1,01	1,01	8084
AacXyn2	<i>Aspergillus aculeatus</i>	2,07	1,86	1,67	1,43	4994
TreXyn3	<i>Trichoderma reesei</i>	2,41	2,02	1,81	1,55	6567
TreXyn5	<i>Trichoderma reesei</i>	2,06	1,75	1,59	1,37	6272

[0265] O desempenho da filtração foi medida conforme descrito anteriormente (“filtração”), e está apresentada como volume de filtrado a diferentes tempos em relação ao controle negativo (branco).

[0266] As atividades enzimáticas de WE-AX e WU-AX (U) foram medidas conforme descrito nas seções “método da xilanase em arabinosilano extraível com água (WE-AX)” e “método da xilanase em arabinosilano não extraível em água (WU-AX)”.

GLICANASES

[0267] As glicanases foram triadas por suas atividades e

características de temperatura, e os resultados são mostrados na Tabela 4.

TABELA 4

GLICANASES SELECIONADAS, SUAS ATIVIDADES E CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

EM RELAÇÃO À TEMPERATURA

Nome	Origem	U/ml	Temperatura ótima, °C	T _{1/2} temp_tampão, °C	T _{1/2} temp_mosto, °C	pH ótimo
TerGlu1	<i>Talaromyces emersonii/ Geosmithia emersonii</i>	7338	70	78	78	3
BsuGluS	<i>Bacillus subtilis</i>	208	55-65	60	68	5-6
BsuGlu103FULL	<i>Bacillus subtilis</i>	391	50-60	53	58	5-6
TreGlu2	<i>Trichoderma reesei</i>	13	40-50	70	74	4,5-6
TreGlu3	<i>Trichoderma reesei</i>	9215	40-51	58	62	4,5-6
TreGlu4	<i>Trichoderma reesei</i>	n,d,	40-52	62	62	4,5-6
TreGlu6	<i>Trichoderma reesei</i>	n,d,	40-53	62	64	4,5-6
TreGlu7	<i>Trichoderma reesei</i>	n,d,	40-54	62	62	4,5-6
TreGlu8	<i>Trichoderma reesei</i>	n,d,	40-55	61	63	4,5-6
BsuGluC CBD	<i>Bacillus subtilis</i>	10	50-60	60	67	5-6
n.d. = Não determinado						

[0268] A atividade/unidades de glicanase foi determinada

conforme descrito no ensaio da atividade de glicanase, conforme descrito acima.

[0269] Com base nos resultados da seleção bioquímica, as glicanases com características adequadas foram escolhidas para testes adicionais em ensaios de aplicação. Os resultados são mostrados na Tabela 5.

TABELA 5

NOME E ORIGEM DAS GLICANASES TRIADAS E A PRODUÇÃO RELATIVA DE EXTRATO OBTIDO COM O USO DE GLICANASES VERSUS BRANCO (SEM ENZIMA)

Nome	Origem	Desempenho de filtração			
		5 min	10 min	15 min	30 min
Branco	Controle negativo	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

[0270] O desempenho da filtração foi medido conforme descrito anteriormente (“filtração”) e está apresentado como volume do filtrado a diferentes tempos em relação ao controle negativo (branco).

[0271] Com base na seleção individual de xilanases e glicanases, experimentos combinatórios foram realizados e os resultados são ilustrados na Tabela 6.

TABELA 6**RESULTADOS DA APLICAÇÃO DA BRASSAGEM A PARTIR DE EXPERIMENTOS****COMBINATÓRIOS DE XILANASES E GLICANASES VERSUS BRANCO E VERSUS 250****UNIDADES DE XILANASE FÚNGICA FXU-S/G ULTRAFLO® MAX; RESULTADOS DE 700****UNIDADES DE CELULASE EGU/G (NOVOZYMES, DINAMARCA) SÃO ILUSTRADOS COMO****PRODUÇÃO RELATIVA DE EXTRATO OBTIDO**

Desempenho de filtração					
Nome	Origem	5 min	10 min	15 min	30 min
Controle		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

[0272] (A origem de UltraFlo® Max pode incluir outros microrganismos além de *A. aculeatus*, conforme descrito no documento WO 05059084).

[0273] O desempenho de filtração foi medido conforme descrito previamente (“filtração”) e é apresentado como volume do filtrado em diferentes tempos em relação ao controle negativo (branco).

[0274] As combinações adequadas foram adicionalmente testadas em uma instalação em escala piloto de 2HL para verificação, e os resultados são mostrados na Tabela 7 e Figura 3.

TABELA 7**RESULTADOS DA APLICAÇÃO DA BRASSAGEM EM ESCALA PILOTO A PARTIR DA****VERIFICAÇÃO DA SELEÇÃO DE GLICANASES E XILANASES**

[0275] A sub-glicanase S B. combinada com tub-xilanase A. foram testadas contra o branco e os dados de UltraFlo® Max coletados foram a fluxo médio (L/h), o aumento da pressão total acumulada durante a clarificação (mm

WC) e a pressão máxima registrada durante a clarificação (mm WC).

ID	Fluxo médio (L/h)	Pressão total acumulada (mm WC)	Pressão máxima (mm WC)
Branco	148	556	356
UltraFlo max	149	478	280
BsuGluS/Atu Xyn3	147	263	163

EXEMPLO 2

[0276] Nesse exemplo, tentou-se mostrar que as xilanases para aplicações de brassagem podem ter uma seletividade muito alta a arabinóxilano solúvel de alto peso molecular (HMWS-AX) e arabinóxilano extraível com água (WE-AX). Acredita-se, pelo presente pedido, que somente quantidades limitadas de arabinóxilano precisam ser solubilizadas. Consequentemente, o potencial relacionado à alteração de sabor é altamente reduzido.

[0277] Uma viscosidade significativamente reduzida facilita a separação entre a pasta e a cerveja. As características desejadas da xilanase para aplicações de brassagem podem incluir um ou mais aspectos na Tabela 8 a seguir:

TABELA 8

CRITÉRIOS DE TRIAGEM PARA A SELEÇÃO DE XILANASE

Especificidade ao substrato da enzima Razão WE-AX/WU-AX tem um impacto na viscosidade
Seletividade ao substrato da enzima Tem um impacto na funcionalidade quanto mais perto dos pontos de ramificação a enzima cortar
Termoestabilidade da enzima Solubilização contínua de AX durante a maceração – termoestabilidade é uma característica-chave

pH ótimo da enzima (pH 5,4 a 5,6)
Inibição da enzima (por exemplo, fator-chave conhecido para xilanases)

TABELA 9**XILANASES – CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS****INIBIÇÃO POR INIBIDORES ENDÓGENOS DE XILANASE DE CEREAIS OCORREM EM****AMBAS XILANASES GH**

Xilanase GH	GH10	GH11
Mw	+ 30 kDa	20 kDa
Especificidade ao substrato	Hidrolisa próximo às substituições de arabinose	Necessita de mais xilose não substituída para hidrolisar AX
Seletividade ao substrato	WE-AX/WU-AX tipicamente > 1	WE-AX/WU-AX tipicamente < 1
SBD	Com frequência separa SBD	BRANCO de SBD clássico, mas BD secundário na superfície
Efeito tecnológico	Redutores de viscosidade	Solubilizante/Redutores de viscosidade

[0278] A arabinoxilano água-insolúvel (WU-AX) em cereais, conforme mostrado na Figura 3, está ligada à estabilidade do bolo de filtro na instalação de brassagem. A concentração de ácido ferúlico (FA) em cereais depende muito do tecido. A concentração mais alta é encontrada no material do pericarpo, enquanto a concentração no endosperma é muito baixa. Concentrações diferentes são relatadas. Uma concentração de 2700 µg/g de fibra insolúvel e 185 µg/g de fibra solúvel é factível (Bunzel *et al.*, 2001, *Journal of Sc. of food and agriculture*, vol. 81, p. 653-60).

[0279] Para contextualizar, esses resultados indicam que FA somente é encontrado a cada 200 moléculas de xilose em arabinoxilano na fibra insolúvel (WU-AX) e a cada 2500 xiloses na fibra insolúvel (WE-AX).

Sabe-se que as xilanases podem levar à formação de alteradores de sabor na cerveja, como ácido ferúlico livre e 4-VG.

MÉTODOS

[0280] Com base nos critérios mencionados nas Tabelas 8 e 9, encontrou-se mais de 15 xilanases adquiridas junto a DuPont Industrial Biosciences como potenciais candidatas. As xilanases foram triadas na aplicação da maceração em laboratório aplicando-se até 30% de cevada em combinação com malte. Entre outros, a velocidade de separação da pasta, nível pentosana/arabinoxilano e viscosidade do mosto foram monitorados. Os principais candidatos foram testados em vários estudos pilotos de brassagem de plantas para testar nossas hipóteses e ligar as características da xilanase à funcionalidade na brassagem. A dosagem ótima do candidato de xilanase selecionado foi testada em combinação com uma β -glicanase.

TABELA 10

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ID da Amostra	Controle	Ref (X+B).	X1	X2	X3
Viscosidade Dinâmica (12 °Plato) mPa.s	1,798	1,670	1,801	1,746	1,794
Extrato (°Plato)	15,1	15,7	15,6	15,2	15,1
Pentosana total (mg/l)	1610	1910	2440	2020	1710

[0281] Nas brassagens de planta piloto, a dosagem enzimática foi a única variável. A aplicação de uma xilanase seletiva a WU-AX (X1) resulta em colapso do fundo do filtro. Os candidatos de xilanases seletivos a WE-AX (referência, X2, X3) resultam em baixo acúmulo de pressão. A referência é uma

mistura de xilanase + β -glicanase.

TABELA 11

ANÁLISES DO MOSTO – ESTUDOS PILOTO DE PLANTAS

ID da Amostra	Ref.	X+B	Xh+B
Extrato (°Plato)	15,70	16,00	15,95
β -glicana no mosto (mg/l)	44	35	25
Viscosidade dinâmica a 12 °Plato (mPa.s)	1,65	1,68	1,68
Pentosana total (mg/l)	3540	2970	3010

TABELA 12

ANÁLISE DE ALDEÍDO DE STRECKER DE CERVEJA ENVELHECIDA

Marcadores de Idade (cerveja de envelhecimento forçado)	Unidade	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

[0282] Misturas otimizadas de uma xilanase seletiva a WE-AX aplicada a uma dosagem média (X) e alta (Xh) em combinação com β -glicanase (B) em 20% cevada/80% malte. Os resultados indicam um bom

desempenho na separação da pasta e cerveja com um baixo risco de formação de alteradores de sabor e colapso do fundo do filtro.

CONCLUSÃO

[0283] O estudo provou a importância da aplicação de xilanases para a brassagem, as quais são altamente seletivas a WE-AX durante a maceração. Os benefícios a seguir são atingidos:

- Bom desempenho na separação da pasta e filtração da cerveja
- Risco minimizado de colapso do fundo do filtro na clarificação
- Potencial reduzido para a formação de alteradores de sabor relacionada à ruptura de arabinosilano
- Tolerância em relação à superdose de xilanase

As xilanases podem com frequência ser aplicadas, com um alto efeito benéfico, em combinação com β -glicanases para o controle da separação.

EXEMPLO 3

[0284] Avaliação das combinações X3/BgIS (também chamado de AtuXyn3/BsuGluS) em dois ensaios de brassagem HL piloto.

MATERIAL E MÉTODOS

EXPERIMENTOS

ENZIMAS

[0285] AtuXyn3 (X3)/ BsuGluS (Bgls) (a): Combinação de (glicanase de *Bacillus*) e X3 (xilanase de *Aspergillus*; BgLS: 0,50 mg proteína/kg grist e X3: 1,50 mg proteína/kg grist).

[0286] AtuXyn3 (X3)/ BsuGluS (Bgls) (b): Como AtuXyn3 (X3)/ BsuGluS (Bgls) (a), mas com aumento de 20% da dose de X3 para testar robustez.

[0287] Referência: Produto enzimático de referência (Ultraflo® Max) dosado a 0,20 kg/T grist.

MATÉRIA-PRIMA

[0288] Material adjunto: cevada 22% p/p.

[0289] Malte: malte Pilsner Chiraz 42,6% p/p, malte Pilsner Quench DMG 35,4% p/p.

[0290] Todo o material usado para o ajuste ácido do pH, cálcio, zinco e dos níveis de amargor são de qualidade alimentar e considerados como materiais padrão de brassagem.

[0291] A receita para a brassagem visou produzir como estilo de cerveja uma cerveja *lager* internacional.

MOAGEM

[0292] Moedor piloto de 2 rolos Künzel. O material moído foi passado pelos rolos duas vezes, simulando um moedor de 4 rolos.

[0293] Grist de malte: o moedor foi usado a 1,5 mm na primeira passagem e 0,7 mm na segunda passagem pelos rolos.

[0294] Grist de cevada: o moedor foi usado a 1,5 mm na primeira passagem e 0,4 mm na segunda passagem pelos rolos.

INSTALAÇÃO DE BRASSAGEM 2 HL

[0295] Todas as brassagens foram baseadas na maceração da infusão HGB (Brassagem de Alta Gravidade) e clarificação padrão de 190 L de mosto visando 16 °Plato. Durante a clarificação, que foi realizada em fluxo fixo, o diferencial de pressão foi registrado (usado como parâmetro para a avaliação do desempenho da clarificação). Todos os materiais de brassagem foram previamente moídos (24 h) e mantidos em baldes fechados antes do contato com a água. Todo o material foi despejado na caldeira de maceração dentro de 3 minutos do início da maceração. O ajuste de cálcio e do pH foram realizados antes da adição de enzimas. O pH (20°C) foi reverificado no intervalo de 52°C. A normalidade de iodo foi confirmada após 10 min a 72°C. A clarificação foi realizada a 78°C.

[0296] O desempenho da clarificação foi avaliado a um fluxo fixo de 90 L/h durante a primeira coleta do mosto. O fluxo foi aumentado para 110 L/h e 130 L/h durante a homogeneização e coleta do mosto fraco. A análise química foi realizada no mosto frio.

FERVURA DO MOSTO

[0297] A fervura foi realizada com o uso de uma caldeira externa com evaporação de 4 a 5%. Os extratos de lúpulo foram adicionados a partir do início da fervura do mosto visando 20 BU na cerveja final.

FERMENTAÇÃO DE 50 L

[0298] Todas as fermentações foram realizadas em tanques cilíndrico-cônicos de 50 L. A brassagem foi realizada de acordo com os procedimentos padrões de operação. A inoculação foi realizada com 15×10^6 células de levedura vivas/mL. A contagem e viabilidade das células de levedura foi calculada com o uso de um contador Nucleo.

PROCESSAMENTO DA CERVEJA

[0299] A placa e filtro de armação operaram a pressão constante. A avaliação do fluxo foi realizada por peso.

[0300] Os dados foram coletados a partir de 1 a 3 placas de filtro.

DESFERMENTAÇÃO

[0301] Todas as cervejas foram desfermentadas a 5,0% de ABV (Álcool por Volume), considerado como o padrão de cerveja *lager* internacional.

ENGARRAFAMENTO

[0302] O CO₂ foi ajustado para 5,0 g/L. Todas as cervejas foram engarrafadas em garrafas padrões de 33 cl em uma máquina de preenchimento automática McLennon com o uso de uma evacuação única.

ANÁLISE DA CERVEJA

[0303] As cervejas frescas foram analisadas com o uso de GC-MS.

[0304] O perfil de envelhecimento químico foi determinado com o uso de GC-MS.

RESULTADOS E OBSERVAÇÕES

MACERAÇÃO

[0305] A maceração foi realizada com a condição a seguir:

[0306] 52°C por 10 min simulando uma maceração de 15 a 20 min com o uso de um moedor em funcionamento.

[0307] 65°C por 40 min.

[0308] 72°C por 30 min.

[0309] 78°C por 10 min.

[0310] Todas as etapas de aumento foram executadas a 1°C. Uma representação gráfica é fornecida na Figura 7.

[0311] Todos os ensaios foram realizados com esse regime de maceração visando uma brassagem de 16 °Plato. Não houve observações para essa etapa do processo.

RESULTADOS E OBSERVAÇÕES

CLARIFICAÇÃO

[0312] A clarificação foi realizada na instalação de brassagem de 2HL com uma carga de 150 kg/m². Isso é representativo para uma operação de uma instalação de brassagem padrão. O controle do processo de clarificação foi realizado como um fluxo fixo a uma média de 100 L/h. A taxa de fluxo inicial é de 90 L/h, aumentando para 130 L/h durante a coleta de mosto fraco. O diferencial de pressão e a medida em linha da bruma foram registradas para as quatro fermentações. A clarificação total e a coleta de mosto foram realizadas durante aproximadamente 2 h.

[0313] Sugere-se que os ensaios de X3/BglS (b) e X3/BglS (a) foram os que obtiveram melhor desempenho de clarificação, seguido pelos ensaios X3/BglS (a) e UF max com o pior desempenho.

TABELA 13**DADOS COLETADOS DURANTE A CLARIFICAÇÃO DA PASTA A PARTIR DE QUATRO****ENSAIOS**

	UF máx.	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
Tempo no tonel de clarificação (kg/m ³)	153	153	153	153
Tempo no tonel de clarificação (min)	154	164	170	154
Diferença de Pressão (cm)	40	30	30	30
Maturação (nº de cortes profundos)	1	1	1	1
Bruma (EBC)	10	15	10	10
Primeira pressão acumulada do mosto (cm/h)	40	33	31	30
Tempo para o primeiro corte profundo (min)	45	60	120	115

[0314] “Pressão diferencial” e “Aumento de pressão do primeiro mosto” na tabela foram medidos como cmWC (cm de coluna d’água) e não como (cm) e (cm/h), respectivamente.

RESULTADOS E OBSERVAÇÕES**ANÁLISE DO MOSTO APÓS FERVURA**

[0315] A análise do mosto frio mostra resultados similares. A análise de β -glicana indica uma sutil diferença entre as amostras.

TABELA 14**ANÁLISE QUÍMICA DO MOSTO FRIO**

Mosto	UF máx	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
Extrato (% plato)	16,09	16,05	15,99	16,1
Cor (EBC)	9,7	9,3	9,3	9,3
pH	5	5,2	5,2	5,2
Iodo (Y/N)	N	N	N	N
Amargor (BU, EBC)	52	51	46	50

TABELA 15**DADOS ANALÍTICOS DO MOSTO FRIO**

Mosto	UF máx	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
Beta-glicano no mosto (mg/L)	49	40	25	30
Viscosidade Dyn. a 12°C (mPa.s)	1,888	1,685	1,679	1,686
Pentosana (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

[0316] (12°C é 12°Plato); (% de Plato pode ser usado de maneira intercambiável com °Plato)

RESULTADOS E OBSERVAÇÕES**BRASSAGEM**

[0317] A análise da cerveja verde é dada na Tabela 16.

TABELA 16**ANÁLISE DA CERVEJA VERDE**

Cerveja Verde	UF máx	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
Álcool (% vol)	6,79	6,79	6,7	6,86

Cerveja Verde	UF máx	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
Extrato real (% P)	6,28	6	6	6
RDF (%)	63,5	63,7	63,5	64,4
Extrato original (% P)	16,29	16,25	16,09	16,24
Cor (EBC)	8,3	8,5	-	-
pH	4,4	4,4	4,4	4,4
SO ₂ (ppm)	7	9	11	10
Amargor (BU, EBC)	29	28	27	27

[0318]A análise da cerveja verde mostra um alto grau de similaridade entre os ensaios. Todos os ensaios têm relativo RDF baixo, mas isso é normalmente visto com a inclusão de 22% de cevada, calculados com base no peso por peso (p/p).

RESULTADOS E OBSERVAÇÕES

FILTRAÇÃO DA CERVEJA

[0319]As amostras de cerveja foram filtradas com o uso de uma placa e filtro de armação a uma pressão fixa. Dois barris de aproximadamente 15 kg foram filtrados e os dados de filtração dos barris individuais são apresentados na Tabela 17. O primeiro barril foi filtrado com o uso de um papel de filtro e o segundo barril foi filtrado com o uso de três papéis de filtro. O diferencial de pressão foi sempre de 0,5 bar. As placas de filtro são KD7 (20 cm x 20 cm) adquiridas junto a Begerow.

[0320]A imagem geral das curvas de filtração, tanto de uma placa de filtro como de três, é a mesma. Acredita-se que o registro de uma placa de filtro pode ser sensível demais para mostrar a real diferença de razão.

TABELA 17**DADOS DA FILTRAÇÃO DO BARRIL A PARTIR DE QUATRO ENSAIOS**

Filtração	UF max	X3/BgIS (a)	X3/BgIS (b)	X3/BgIS (a)
Velocidade de filtração – papel de filtro 1 (L/h)	4,8	5,6	9,9	11,8
Velocidade de filtração – papel de filtro (L/h)	77,2	59,6	70,6	105,4

RESULTADOS E OBSERVAÇÕES**ANÁLISE DA CERVEJA FINAL**

[0321] As cervejas do ensaio foram analisadas de acordo com os procedimentos padrões de operação (EBC) e são apresentadas na Tabela 18.

TABELA 18**ANÁLISE DA CERVEJA FINAL**

Cerveja Acabada	UF max	X3/BgIS (a)	X3/BgIS (b)	X3/BgIS (a)
Álcool (%)	4,82	4,89	5,01	4,92
Extrato real (%P)	4,5	4,6	4,6	4,4
RDF (%)	63,2	63,4	63,8	64,3
Extrato original (%P)	11,85	11,99	12,19	11,89
Cor (EBC)	4,8	4,9	5	5
pH	4,4	4,4	4,4	4,4
SO ₂ (ppm)	13	13	10	6
Amargor (BU, EBC)	22	22	20	18
Opacidade (EBC)	0,43	0,4	0,38	0,4
Opacidade total – 5d-60 dg C (EBC)	8,6	12,9	7,3	6,2

Cerveja Acabada	UF max	X3/BgIS (a)	X3/BgIS (b)	X3/BgIS (a)
CO ₂ (g/L)	4,9	5,3	5,1	5,2
Diacetila (ppb)	12	11	8	10
Retenção principal (S)	107	111	119	108
Volume de espuma (mL)	452	476	460	470

[0322] Resultados e observações: aldeídos de Strecker e “marcadores de idade” na cerveja final.

[0323] A análise foi realizada tanto em cerveja fresca como em cerveja envelhecida. Os aldeídos de Strecker e os “marcadores de idade e aquecimento” (2-Me-Pr (2-metil-propanal), 2-Me-Bu (2-metil-butanal), 3-Me-Bu (3-metil-butanal), Furfural, Metional, PheAcal (fenilacetaldeído) e T2N (trans-2-nonenal)) foram analisados por GS-MS tanto em cerveja fresca como em cerveja envelhecida. Os dados da análise da cerveja fresca são apresentados na Tabela 19.

TABELA 19

ANÁLISE DOS ALDEÍDOS DE STRECKER DA CERVEJA FRESCA

[0324] Os marcadores para aquecimento e envelhecimento (furfural e trans-2-nonenal) são usados como uma amostra controle.

Marcadores de envelhecimento (cerveja fresca)	UF máx	X3/BgIS (a)	X3/BgIS (b)	X3/BgIS (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

Marcadores de envelhecimento (cerveja fresca)	UF máx	X3/BgIS (a)	X3/BgIS (b)	X3/BgIS (a)
PheAcal (ppb)	6	6	6	7
T2N (ppb)	0,0011	0,005	0,004	0,006

[0325] As cervejas do ensaio foram incubadas a 37°C por 2 semanas antes da análise de aldeídos de Strecker. Os dados para as amostras de cervejas envelhecidas são apresentados na Tabela 20.

TABELA 20

ANÁLISE DOS ALDEÍDOS DE STRECKER DE CERVEJA ENVELHECIDA

[0326] Os marcadores para aquecimento e envelhecimento (furfural e trans-2-nonenal) são usados como uma amostra controle.

Marcadores de envelhecimento (cerveja fresca)	UF máx	X3/BgIS (a)	X3/BgIS (b)	X3/BgIS (a)
2-ME-Pr (ppb)	25	23	22	26
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	6
T2N (ppb)	0,0017	0,022	0,022	0,022

[0327] Os dados apresentados na Tabela 20 mostram um aumento esperado no nível de aldeídos Strecker. O aumento em furfural e trans-2-nonenal atingem um nível esperado.

CONCLUSÃO

[0328] Com base nos experimentos em escala pilotos, pode-se concluir que as razões de BgIS e X3 testadas nesse Experimento têm

desempenho tão bom ou ainda melhor do que a referência UltraFlo Max na brassagem em escala piloto.

[0329] Os resultados são surpreendentes, tendo em vista a matéria-prima complexa usada, a inclusão de 22% de cevada em combinação com 300 mg/L de malte contendo β -glicana. O desempenho não é apenas visto nos resultados de separação da pasta, mas também na filtração da cerveja. Devido à baixa solubilidade do material da parede celular quando do uso de BREW2 (dados de pentosana), um menor grau de material de parede celular, que pode causar problemas de qualidade em relação à alteração de sabor e estabilidade, pode ser registrado.

[0330] Finalmente, pode-se concluir que um aumento de 20% na dose do componente de xilanase em X3/BglS (b) parece não ter impacto em qualquer um dos parâmetros avaliados, indicando que X3/BglS (a) é uma forte combinação enzimática.

SEQUÊNCIAS:

[0331] **AtuXyn3**, *Aspergillus tubigenis* (SEQ ID NO: 1), 302 aa
 QASVSI DT KFKAHGKKYLGNIGDQYTLTKNSKTPAIKADFGALTPENSMKWDA
 TEP SRGQFSFSGSDYLVNFAQSNNKLIRGHTLVWHSQ LPSWVQAITDKNTLIE
 VMKNHITTVMQHYKGKIYAWDVVNEIFNEDGSLRDSVFYQVIGEDYVRIAFETA
 RAADPNAKLYINDYNLDSASYPKLTGMVSHVKKWIEAGIPIDGIGSQTHLSAGG
 GAGISGALNALAGAGTKEIAVTELDIAGASSTDYVEVVEACL DQPKCIGITVWG
 VADPDSWRSSSTPLLFDSNYPKPAYTAIANAL

[0332] **TerXyn1**, *Geosmithia emersonii* (*Taleromyces emersonii*)
 (SEQ ID NO: 2)
 AGLNTAAKAIGLKYFGTATDNPELSDTAYETQLNNTQDFGQLTPANSMKWDA
 TEPEQNVFTFSAGDQIANLAKANGQMLRCHNLVWYNQLPSWVTSGSWTNET
 LLAAMKNHITNVVTHYKGQCYAWDVVNEALNDDGTYRSNVFYQYIGEAYIPIA
 FATAAAADPNAKLYINDYNIEYPGAKATAAQN LVKLVQSYGARIDGVGLQSHF

IVGETPSTSSQQQNMAAFTALGVEVAITELDIRMQLPETEALLTQQATDYQSTV
 QACANTKGCVGITVWDWTDKYSWVPSTFSGYGDACPWDANYQKKPAYEGIL
 TGLGQTVTSTTYIISPTTSVGTGTTTSSGGSSGGTTGVAQHWEQCGGLGWTGP
 TVCASGYTCTVINEYYSQCL

[0333] **AtuXyn4**, *Aspergillus tubigensis* (SEQ ID NO: 3)
 EPIEPRQASVSIDTKFKAHGKLYGNIGDQYTLTKNSKTPAIKADFGALTPENS
 MKWDATEPSRGQFSFSGSDYLVNFAQSNNKLIRGHTLVWHSQLPSSWVQSIT
 DKNTLIEVMKNHITVVMQHYKGIYAWDVVNEIFNEDGSLRDSVIFYKVIDEDYV
 RIAFETARAADPNAKLYINDYNLDSASYPKLTGMVSHVKKWIAAGIPIDGIGSQT
 HLSAGGGAGISGALNALAGAGTKEIAVTELDIAGASSTDYVEVVEACLNPCKCI
 GITVWGVADPDSWRSSSTPLLFDSNYNPKPAYTAIANAL

[0334] **AacXyn2**, *Aspergillus aculeatus* (SEQ ID NO: 4)
 MVGLLSITAALAATVLPNIVSAVGLDQAAVAKGLQYFGTATDNPELTDIPYVTQ
 LNNTADFGQITPGNSMKWDATEPSQGTFTFTKGDVIADLAEGNGQYLRCHTL
 VWYNQLPSWVTSGTWTNATLTAALKNHITNVVSHYKKGKCLHWDVVNEALND
 DGTYRTNIFYTTIGEA YIPIAFAAAAAADPDAKLFYNDYNLEYGGAKAASARAIV
 QLVKNAGAKIDGVGLQAHFSVGTVPSTSSLVSVLQSFTALGVEVAYTEADVRL
 LPTTATTLAQSSDFQALVQSCVQTTGCVGFTIWDWTDKYSWVPSTFSGYGA
 ALPW DENLVKKPAYNGLLAGMGVTVTTTTTTTTATATGKTTTTTTGATSTGTT
 AAHWGQCGGLNWSGPTACATGYTCTYVNDYYSQCL

[0335] **TreXyn3**, *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 5)
 MKANVILCLLAPLVAALPTETIHLDPELAALRANL TERTADLWDRQASQSIDQLI
 KRKGKLYFGTATDRGLLQREKNAAIQADLGQVTPENSMKWQSLENNQGQLN
 WGDADYLVNFAQQNGKSIRGHTLIWHSQLPWVNNINNADTLRQVIRTHVST
 VVGRYKGIKIRAWDVVNEIFNEDGTLRSSVFSRLLGEEFVSI AFRAARDADPSA
 RLYINDYNLDRANYGKVNGLKTYVSKWISQGVPI DGIGSQSHLSGGGGSGTLG
 ALQQLATVPVTELAITELDIQGAPTTDYTQVVQACLSVSKCVGITVWGISDKDS
 WRASTNPLLF DANFNPKPAYNSIVGILQ

[0336] **TreXyn5**, *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 6)
 QCIQP GTG YNNG YFYS YWNDGHGG VTYCNGPGGQFSVNWSNSGNFVGGK
 GWQPGTKNRVINFSGSYNPNGNSYLSVYGWSRNPLIEYYIVENFGTYNPSTG
 ATKLGEVTS DGSVYDIYRTQRVNQPSIIGTATFYQYWSVRRNHRSSGSVNTAN
 HFNAWAQQGLTLGTMDYQIVAVEGYFSSGSASITVSD

[0337] BsuGluS, *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO: 7), 214 aa
 QTGGSFFDPFNGYNSGFWQKADGYSNGNMFNCTWRANNVSM TSLGEMRLA
 LTSPAYNKFD CGENRSVQTYGYGLYEVRMKPAKNTGIVSSFFTYTGPTDGTP
 WDEIDIEFLGKDTTKVQFNYYTNGAGNHEKIVDLGFDAANAYHTYAFDWQPN
 SIKWYVDGQLKHTATNQIPTTPGKIMMNLWNGTGVDEWLGSYNGVNPLYAHY
 DWVRYTKK

[0338] TerGlu1, *Geosmithia emersonii* (*Taleromyces emersonii*)
 (SEQ ID NO: 8)
 APVKEKGIKKRASPFQWFGSNESGA EFGNNNIPGVEGTDYTFPNTSAIQILIDQ
 GMNIFRVPFLMERMVPNQMTGPVDSAYFQGYSQVINYITSHGASAVIDPHNF
 GRYNNIISSPSDFQTFWHTIASNFDNADNVIFDTNNEYHDMDESLVVQLNQA
 AIDGIRAAGATSQYIFVEGNSWTGAWTWTQVNDAMANLTD PQNKIVYEMHQY
 LDSDGS GTS DQCVNSTIGQDRVESATAWLKQNGKKAILGEYAGGANSVCETA
 VTGMLDYLANNTDVWTGAIWWAAGPWWGDYIFSMEPPSGIAYEQVLP LLQP
 YL

[0339] BsuGlu103FULL, *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO: 9)
 DDYSVVEEHGQLSISNGELVNERGEQVQLKGMSSHGLQWYGQFVNYESMK
 WLRDDWGITVFRAAMY TSSGGYIDDPSVKEKVKETVEAAIDLGIYVIIDWHILSD
 NDPNIYKEEAKDFDEMSELYGDYPNVIYEIANEPNGSDVTWDNQIKPYAEEVI
 PVIRDNDPNNIVIVGTGTWSQDVH HADNAQLADPNV MYAFHFYAGTHGQNL R
 DQVDYALDQGAAIFVSEWG TSAATGDGGVFLDEAQVWIDFMDERNLSWANW
 SLTHKDESSAALMPGANPTGGWTEAELSPSGTFVREKIRE SASIPPSDPTPPS
 DPGEPDPGEPDPTPPSDPGEYPAWDSNQIYTNEIVYHNGQLWQAKWWTQN

QEPGDPYGPWEPLKSDPDSGEPDTPPSDPGEYPAWDSNQIYTNEIVYHNG
QLWQAKWWTQNQEPGDPYGPWEPLN

[0340] TreGlu2, *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 10)

QQT VWGQCGGIGWSGPTNCAPGSACSTLNPYYAQCIPGATTITTSTRPPSGP
TTTTTRATSTSSSTPPTSSGVRFAGVNIAGDFGCTTDGTCVTSKVYPPLKNFT
GSNNYPDGIGQM QHFVNDDGMTIFRLPVGWQYLVNNNLGGNLDSTSISKYD
QLVQGCLSLGAYCIVDIHNYARWNGGIIGQGGPTNAQFTSLWSQLASKYASQ
SRVWFGIMNEPHDVNINTWAATVQEVVTAIRNAGATSQFISLPGNDWQSAGA
FISDGSAAALSQVTNPDGSTTNLIFDVHKYLDSDNSGTHAECTTNNIDGAFSPL
ATWLRQNNRQAILTETGGGNVQSCIQDMCQQIQYLNQNSDVYLG YVVGWAG
SFDSTYVLTETPTGSGNSWTDTSLVSSCLARK

[0341] TreGlu3, *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 11)

QTSCDQWATFTGNGYTVSNNLWGASAGSGFGCVTAVSLSGGASWHADWQ
WSGGQNNVKS YQNSQIAIPQKRTVNSISSMPTTASWSYSGSNIRANVA YDLFT
AANPNHVTYSGDYELMIWLKGYGDIGPIGSSQGT VNVGGQSWTLYYGYNGA
MQVYSFVAQTNTTNYSGDVKNFFNYLRDNKG YNAAGQYVLSYQFGTEPFTG
SGTLNVA SWTASIN

[0342] TreGlu4, *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 12)

HGHINDIVINGVWYQAYDPTTFPYESNPPIVVGWTAADLDNGFVSPDAYQNPD
IICHKNATNAKGHASVKAGDTILFQWVPVWPHPGPIVDYLANCNGDCETVDK
TTLEFFKIDGVLLSGGDPGTWASDVLISNNNTWVVKIPDNLAPGNYVLRHEII
ALHSAGQANGAQNYPQCFNIAVSGSGSLQPSGVLGTDLYHATDPGVLINIYTS
PLNYIIPGPTVVSGLPTSVAQGSSAATATASATVPGGGSGPTSRTTTTARTTQ
ASSRPSSTPPATTSAPAGGPTQTLYGQCGGSGYSGPTRCAPPATCSTNPYY
AQCLN

[0343] TreGlu6, *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 13)

AFSWKNVKLGGGGGFVPGIIFHPKTKGVAYARTDIGGLYRLNADDSWTA VTD
GIDNAAGWHN WGIDAVALDPQDDQKVYAAVGM YTN SWDPSNGAIIRSSDRG

ATWSFTNLPFKVGGNMPGRGAGERLAVDPANSNIIYFGARSGNGLWKSTDG
 GVTFSKVSSFTATGTYPDPSDSNGYNSDKQGLMWVTFDSTSSTTGGATSRIF
 VGTDNAITASVYVSTNAGSTWSAVPGQPGKYFPHKAKLQPAEKALYLTYSWW
 PDAQLFIRSTDSGTTWSPIWAWASYPTETYYYYSISTPKAPWIKNNFIDVTSESP
 SDGLIKRLGWMIESLEIDPTDSNHWL YGTGMTIFGGHDL TNWDTRHNVSIQSL
 ADGIEEFSVQDLASAPGGSELLAAVGDDNGFTFASRNDLGTSPQTVWATPTW
 ATSTSVDYAGNSVKSVVRVGNTAGTQQVAISSDGGATWSIDYAADTSMNGGT
 VAYSADGDTILWSTASSGVQRSQFQGSFASVSSLPAGAVIASDKKTNSVFYA
 GSGSTFYVSKDTGSSFTRGPKLGSAGTIRDIAAHPTTAGTLYVSTDVGIFRSTD
 SGTTFGQVSTALNTYQIALGVGSGSNWNL YAFGTGPSGARLYASGD SGAS
 WTDIQGSQGFSGSIDSTKVAGSGSTAGQVYVGTNGRGRVFYAQGTVGGGTGGT
 SSSTKQSSSSTSSASSSTTLRSSVVSTTRASTVTSSRTSSAAGPTGSGVAGH
 YAQCGGIGWTGPTQCVAPYVCQKQNDYYYYQCV

[0344] TreGlu7, *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 14)

HGQVQNFTINGQYNQGFILDYYYQKQNTGHFPNVAGWYAEDLDLGFISPDQY
 TTPDIVCHKNAAPGAISATAAAGSNIVFQWGPVWPHPYGPVITYVVECSGSC
 TTVNKNLNRWVKIQEAGINYNTQVWAQQDLINQGNKWTVKIPSSLRPGNYVF
 RHELLAAHGASSANGMQNYPQCVNIAVTGSGTKALPAGTPATQLYKPTDPGIL
 FNPYTTITSYTIPGPALWQG

[0345] TreGlu8, *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 15)

GKIKYLGVAIPGIDFGCDIDGSCPTDTSSVPLLSYKGGDGAGQMKHFAEDDGL
 NVFRISATWQFVLNNTVDGKLDELNWGSYNKVVNACLETGAYCMIDMHN FAR
 YNGGIIGQGGVSDDIFVDLWVQIAKYEDNDKIIFGLMNEPHDL DIEIWAQTCQ
 KVVTAIRKAGATSQMILLPGTNFASVETYVSTGSAEALGKITNPDGSTDLLYFD
 VHKYLDINNSGSHAECTTDNVDAFNDFADWLRQNKRQAISETGASMEPSCM
 TAFCAQNKAISENSDVYIGFVGWGAGSFDTSYILTLTPLGKPGNYTDNKL MNE
 CILDQFTLDEKYRPTPTSISTAAEETATATATSDGDAPSTTKPIFREETASPTPN
 AVTKPSPDTS DSSDDDKDSAASMSAQGLTGTVLFTVAALGYMLVAF

[0346] BsuGluC CBD, *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO: 16)
MKRSISIFITCLLITLLTMGGMIASPASAAGTKTPVAKNGQLSIKGTQLVNRD GK
AVQLKGISSHGLQWYGEYVNKDSLKWL RDDWGITVFRAAMYTADGGYIDNPS
VKNKVKEAVEAAKELGIYVIIDWHILNDGNPNQNKEKAKEFFKEMSSLYGNTPN
VIYEIANEPNGDVNWK RDIKPYAEEVISVIRKNDPDNIIIIVGTGTWSQDVNDAAD
DQLKDANVMYALHFYAGTHGQFLRDKANYALSKGAPIFVTEWGTSDASGNG
GVFLDQSREWLKYLD SKTISWVNWNLSDKQESSSALKPGASKTGGWRLSDL
SASGTFVRENILG TKDSTKDIPETPSKDKPTQENGISVQYRAGD GSMNSNQIR
PQLQIKNNGNTTVDLKDV TARYWYKAKNKGQNFDCDYAQIGCGNVTHKFVTL
HKPKQGADTYLELGFKNGLAPGASTGNIQLRLHNDDWSNYAQSGDYSFFKS
NTFKTTKKITLYDQGKLIWGTEPN

[0347] BsuXyn3, xilanase variante de *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO:
17)
ASTDYWQNWTFGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTTGSPFRT
INYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLIEYYVVD SWGTYRPTGTYKGTVKSDG
GTYDIYTTTRYNAPSIDGDDTTFTQYWSVRQSKRPTGSNATITFSNHVNAWKS
HGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSSNVTW

[0348] BsuXyn4, xilanase variante de *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO:
18)
ASTDYWQNWTDGYGIVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTTGSPFRT
INYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLIEYYVVD SWGTYRPTGTYKGTVYSDG
GWYDIYTATRDNAPSIDGDFTTFTQYWSVRQSKRPTGSNATITFSNHVNAWR
SHGMDLGSNWAYQVMATEGYLSSGSSNVTW

REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSIÇÃO, caracterizada por compreender uma enzima que exibe atividade endo-1,4- β -xilanase, a qual consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1, em combinação com uma enzima que exibe atividade endo 1,3(4)- β -glicanase, a qual consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 7.

2. USO DE UMA COMPOSIÇÃO, conforme definida na reivindicação 1, caracterizado por ser na produção de um alimento, ração, ou produto de bebida de malte, na produção de massa ou produtos assados, na preparação de polpa ou papel, para a preparação de componentes cereais, tais como, nos quais o cereal é centeio, trigo ou cevada, na produção de cerveja ou modificação de subprodutos a partir de um processo de brassagem (*brewing*), na produção de vinho ou suco, ou na produção de um biocombustível de primeira ou de segunda geração, tal como bioetanol.

3. MÉTODO DE ALTERAÇÃO DA FILTRABILIDADE de um material que compreende amido, caracterizado pelo dito método compreender a etapa de tratamento do dito material que compreende amido com uma composição, conforme definida na reivindicação 1.

4. MÉTODO DE REDUÇÃO DA PRESSÃO ACUMULADA durante a clarificação (*lautering*) em uma aplicação de brassagem, caracterizado pelo dito método compreender a etapa de tratamento de uma pasta de brassagem com uma composição, conforme definida na reivindicação 1.

5. MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM ALIMENTO, ração ou produto de bebida, tal como uma bebida alcoólica ou não alcoólica, tal como uma bebida à base de cereal ou malte, como cerveja ou uísque, caracterizado pelo dito método compreender a etapa de tratamento de um material que compreende amido com uma composição, conforme definida na reivindicação 1.

6. MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PASTA DE

BRASSAGEM, caracterizado pelo método compreender a etapa de tratamento de um material que compreende amido com uma composição, conforme definida na reivindicação 1.

7. MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM BIOCOMBUSTÍVEL de primeira ou de segunda geração, tal como bioetanol, caracterizado pelo dito método compreender a etapa de tratamento de um material que compreende amido com uma composição, conforme definida na reivindicação 1.

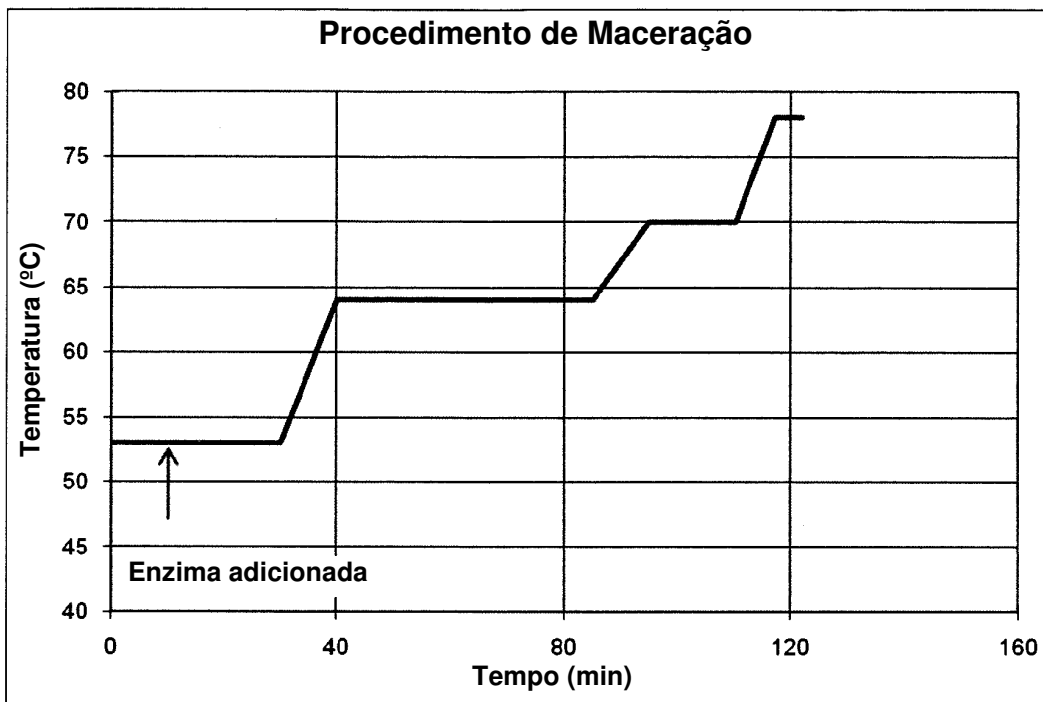
Fig. 1

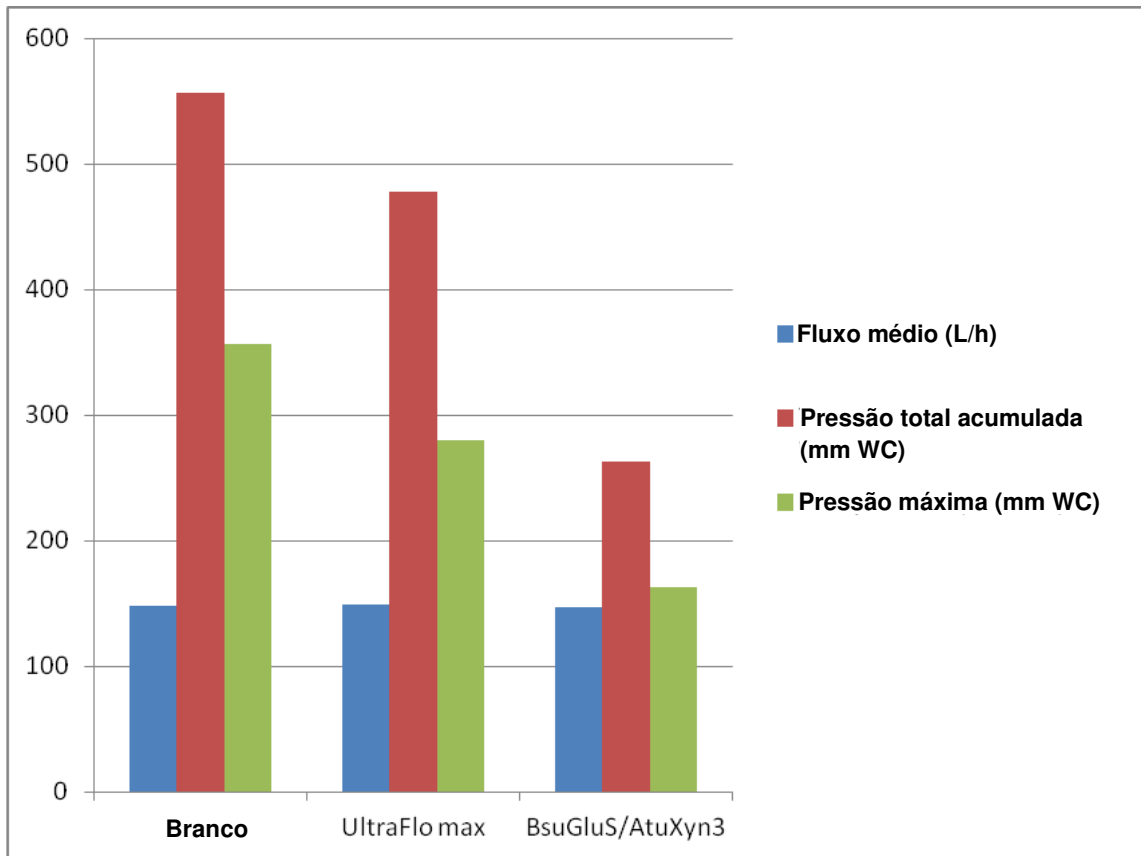
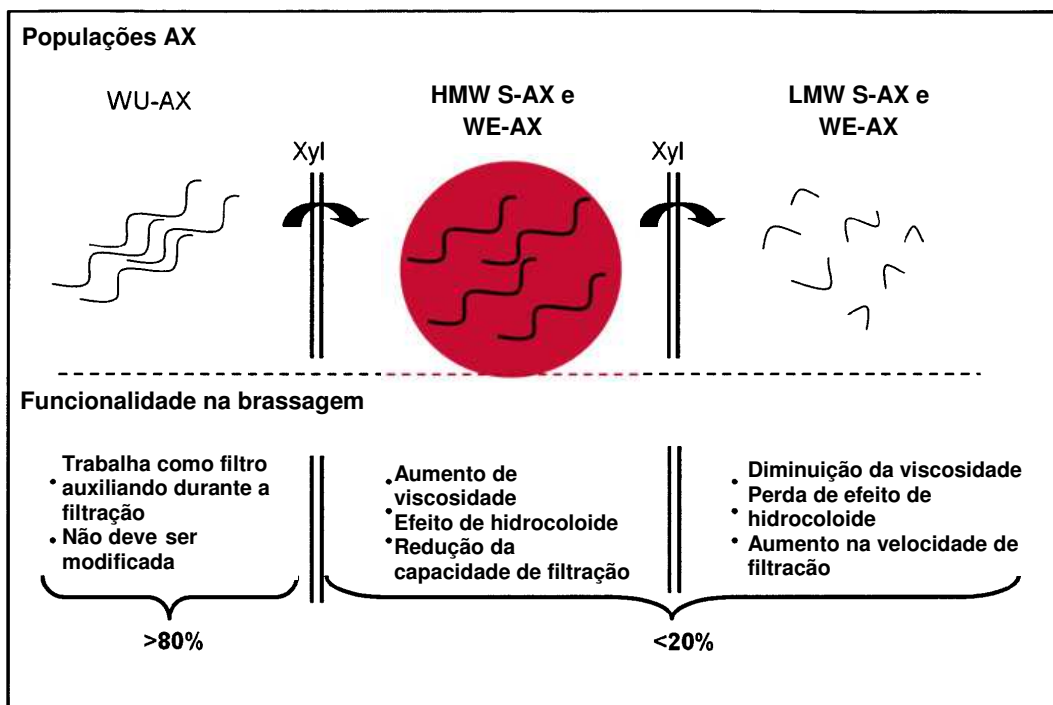
Fig. 2

Fig. 3

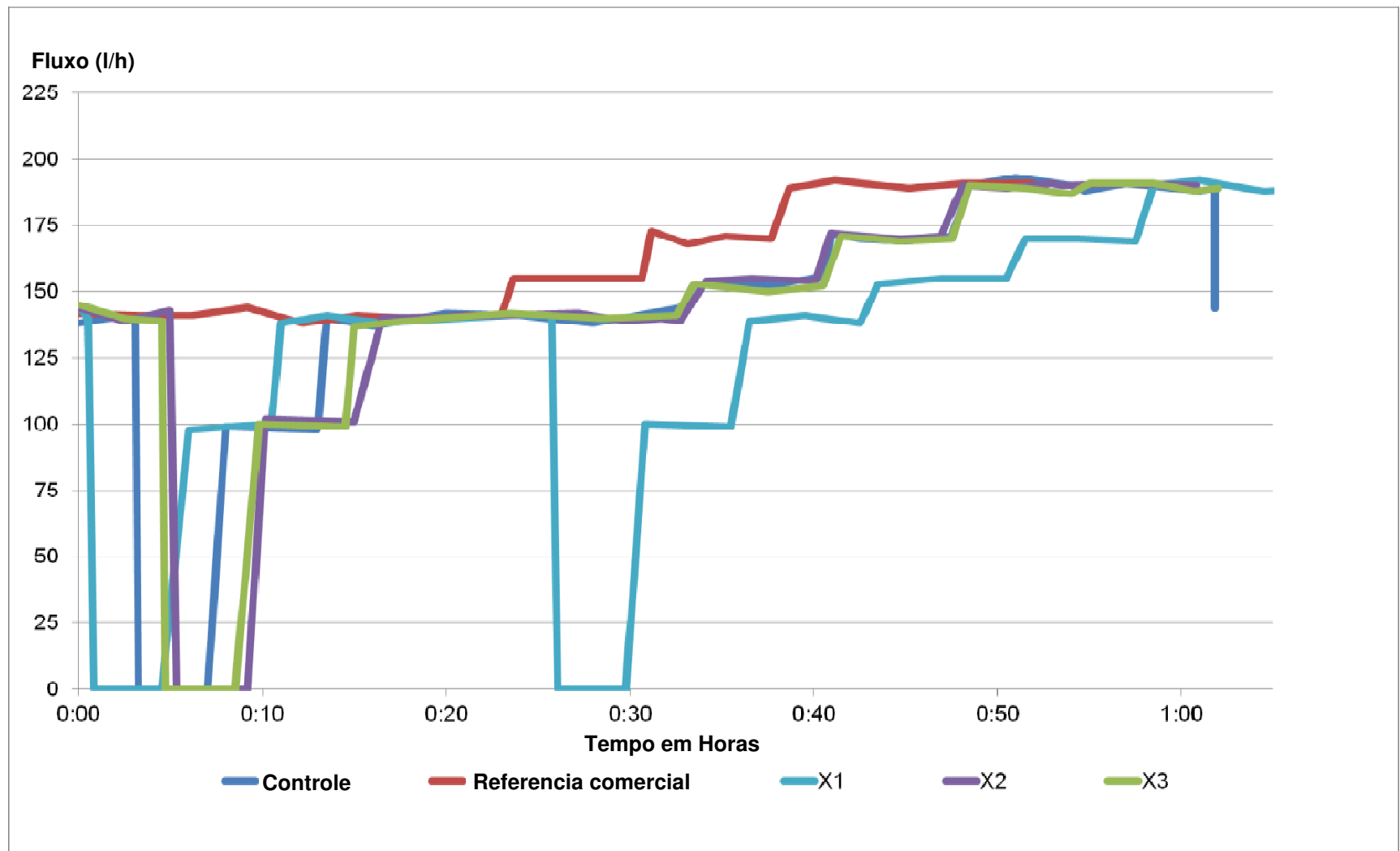


Fig. 4

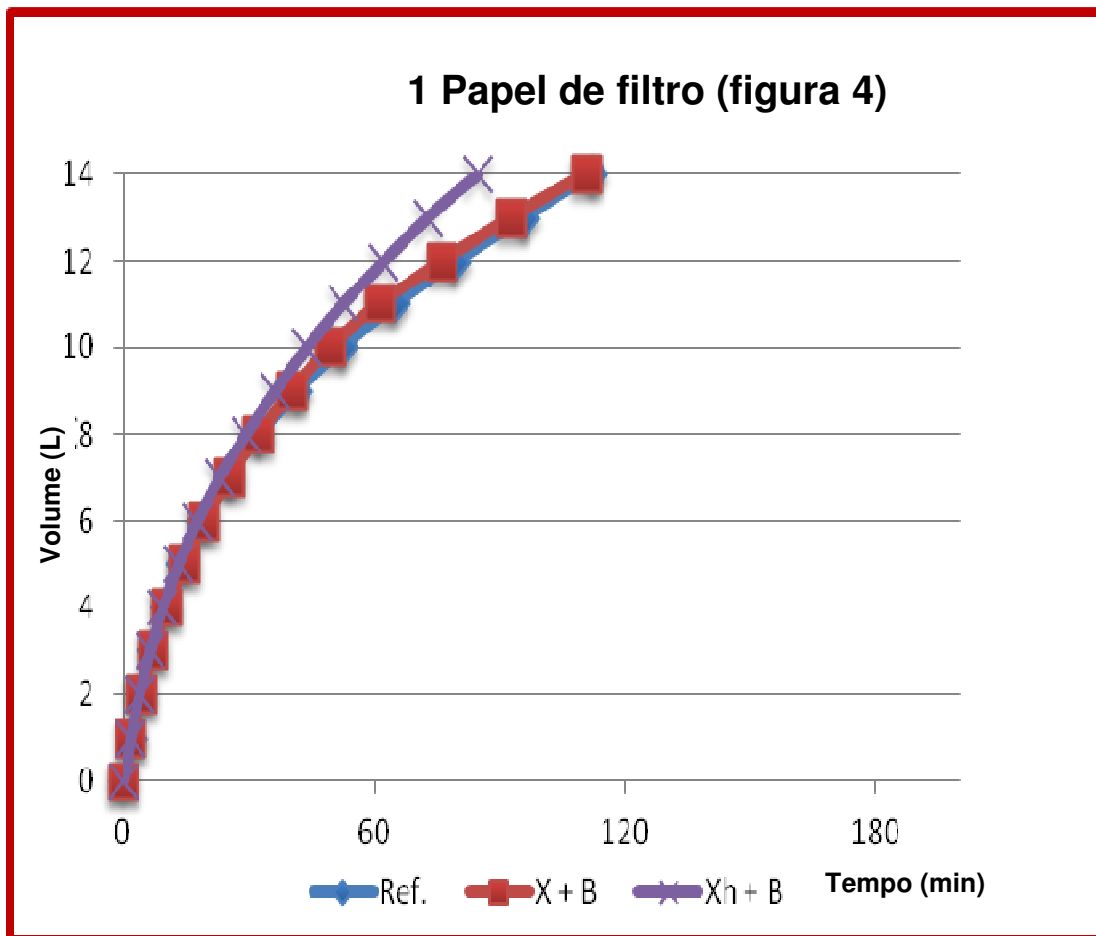
Fig. 5

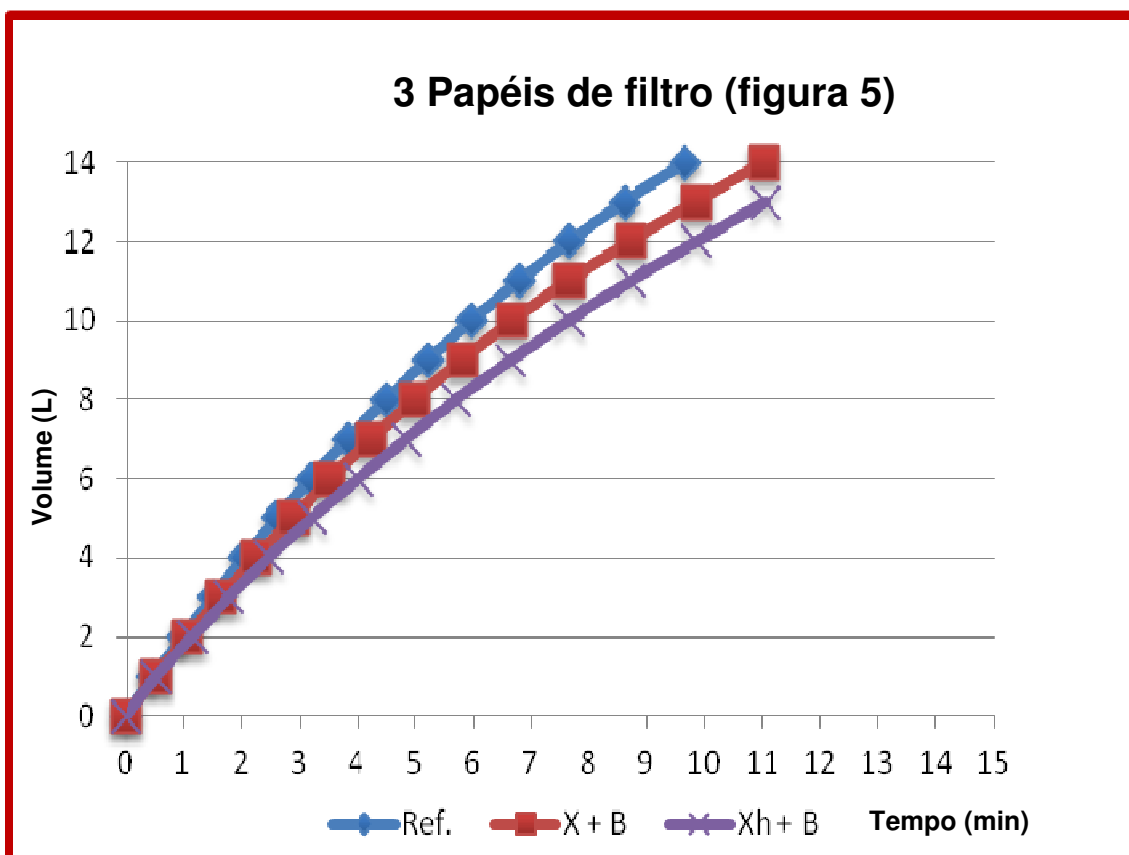
Fig. 6

Fig. 7

