



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **128152** (13) **C2**
(51) МПК

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 9/26 (2006.01)

C12N 9/30 (2006.01)

C12P 7/08 (2006.01)

C12R 1/66 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2014 02546**

(22) Дата подання заявки: **14.09.2012**

(24) Дата, з якої є чинними
права інтелектуальної
власності: **25.04.2024**

(31) Номер попередньої
заявки відповідно до
Паризької конвенції: **11181241.8,
61/534,574,
61/676,535**

(32) Дата подання
попередньої заявки
відповідно до
Паризької конвенції: **14.09.2011,
14.09.2011,
27.07.2012**

(33) Код держави-учасниці
Паризької конвенції,
до якої подано
попередню заявку: **EP,
US,
US**

(41) Публікація відомостей
про заявку: **10.10.2014, Бюл.№ 19**

(46) Публікація відомостей
про державну
реєстрацію: **24.04.2024, Бюл.№ 17**

(86) Номер та дата
подання міжнародної
заявки, поданої
відповідно до
Договору РСТ **PCT/EP2012/068041,
14.09.2012**

(72) Винахідник(и):
**Соренсен Дженс Фрісбек (DK),
Міллер Лоун Бронд (DK)**

(73) Володілець (володільці):
ДЮПОН НУТРИШИН БІОСАЙНСЕС АПС,
Langebrogade 1, P.O. Box 17, DK-1001
Copenhagen K, Denmark (DK)

(74) Представник:
Сердюк Ірина Георгіївна, реєстр. №351

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:
WO 2010/128140 A1, 11.11.2010
WO 9713853 A2, 17.04.1997
WO 2009/108941 A2, 03.09.2009
WO 2005/059084 A1, 30.06.2005
ITO K ET AL. CLONING AND SEQUENCING
OF THE XYNA GENE ENCODING
XYLANASE A OF ASPERGILLUS-KAWACHII.
BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY
BIOCHEMISTRY, JAPAN SOCIETY FOR
BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, AND
AGROCHEMISTRY, TOKYO, JAPAN.
01.01.1992, vol. 56, № 6, P. 906 - 912
JUNQING WANG ET AL. Cloning and
sequence analysis of a novel xylanase gene,
Auxyn10A, from Aspergillus usamii.
BIOTECHNOLOGY LETTERS. 01.05.2011,
vol. 33, № 5, P. 1029 - 1038

(54) ФЕРМЕНТНА КОМПОЗИЦІЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується ферментної композиції, що містить фермент, який придатний для застосування при одержанні харчового продукту, кормового продукту або солодового продукту-напою, наприклад, у процесі пивоваріння.

UA 128152 C2

ГАЛУЗЬ ВИНАХОДУ

Даний винахід відноситься до ферментів з поліпшеними властивостями та до композицій, які містять дані ферменти, що придатні для застосування при одержанні їжі, напою (наприклад, пива), корму або біопалива, наприклад, у процесі пивоваріння.

5 ПЕРЕДУМОВИ ВИНАХОДУ

Застосування ферментів при одержанні пива є добре відомим. Застосування ферментів на етапі затирання для поліпшення фільтрувальності затору та збільшення виходу екстракту описано у патентному документі WO 97/42302.

10 Патентні документи WO2005118769 і WO2005059084 мають відношення до етапу затирання та фільтрації у способі для одержання пива і до ферментних композицій для застосування у даному способі.

Патентний документ WO1999057325 має відношення до штамів *Penicillium funiculosum*, до нових ферментних сумішей, одержаних з них, та їх послідовностей нуклеїнової кислоти.

15 Однак, існує потреба у поліпшених ферментах, а також комбінації ферментів, придатних при одержанні харчових продуктів і продуктів-напоїв, наприклад, на етапах затирання, розварювання та фільтрації при одержанні спиртного напою, такого як пиво або віскі.

МЕТА ВИНАХОДУ

20 Метою варіантів здійснення даного винаходу є забезпечення ферментів, що придатні для одержання харчових продуктів і продуктів-напоїв, наприклад, при одержанні спиртного або безалкогольного напою, наприклад, напою на основі злаку або на основі солоду, наприклад, пива або віскі. Представлені ферменти можуть мати поліпшені властивості щодо застосування у пивоварінні. Цей широкий спектр поліпшених властивостей включає, наприклад, поліпшені оптимальні значення температури, поліпшене співвідношення активності у відношенні розчинних (WE-AX) і нерозчинних (WU-AX) арабіноксиланових субстратів, зменшене загальне підвищення тиску під час етапів фільтрування пивного сусла та/або фільтрації процесу пивоваріння, а також підвищену фільтрувальність матеріалу, обробленого ферментом.

25 КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Автор(и) даного винаходу виявили, що дані один або декілька ферментів, а також певні комбінації ферментів мають поліпшені властивості у порівнянні з відомими ферментами і комбінаціями ферментів, особливо, у зв'язку із застосуванням у процесі пивоваріння, де крохмаломісткий матеріал обробляють одним або декількома ферментами з одержанням пивного затору.

35 Таким чином, у першому аспекті даний винахід відноситься до ферменту, який характеризується енд-1,4- β -ксилазназною активністю, причому даний фермент містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 80% ідентичність із будь-якою послідовністю, вибраною з 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 і SEQ ID NO:18 або їх будь-якого функціонального фрагмента.

40 Використовуваний у даному документі вираз "функціональний фрагмент" відноситься до усіченого варіанта ферменту практично з таким же або щонайменше із значним ступенем ферментної активності, як і у еталонного ферменту, що не є усіченим.

У другому аспекті даний винахід відноситься до ферменту, який характеризується енд-1,3(4)- β -глюканазною активністю, причому даний фермент містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 80% ідентичність із будь-якою послідовністю, вибраною з SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 або їх будь-якого функціонального фрагмента.

45 У третьому аспекті даний винахід відноситься до ДНК-конструкта, який містить послідовність ДНК, що кодує фермент згідно з даним винаходом.

У додатковому аспекті даний винахід відноситься до рекомбінантного вектора експресії, який містить ДНК-конструкт, що містить послідовність ДНК, яка кодує фермент згідно з даним винаходом.

50 У додатковому аспекті даний винахід відноситься до клітини, яка була трансформована ДНК-конструктом, що містить послідовність ДНК, яка кодує фермент згідно з даним винаходом.

У додатковому аспекті даний винахід відноситься до препарату, який містить фермент, або ДНК-конструкта, або вектора, або клітини згідно з даним винаходом.

55 У додатковому аспекті даний винахід відноситься до композиції, яка містить фермент, що характеризується енд-1,4- β -ксилазназною активністю, згідно з даним винаходом у комбінації з будь-якою однією або декількома β -глюканазами.

60 У додатковому аспекті даний винахід відноситься до композиції, яка містить фермент, що характеризується енд-1,3(4)- β -глюканазною активністю, згідно з даним винаходом у комбінації з будь-якою однією або декількома ксиланазами.

У додатковому аспекті даний винахід відноситься до застосування ферменту згідно з даним винаходом, або препарату згідно з даним винаходом, або композиції згідно з даним винаходом при одержанні харчового продукту, кормового продукту або солодового продукту-напою, наприклад, пива або віскі.

5 У додатковому аспекті даний винахід відноситься до застосування ферменту згідно з даним винаходом, або препарату згідно з даним винаходом, або композиції згідно з даним винаходом при одержанні заготовок із тіста або випечених продуктів.

У додатковому аспекті даний винахід відноситься до застосування ферменту згідно з даним винаходом, або препарату згідно з даним винаходом, або композиції згідно з даним винаходом при одержанні пульпи або паперу.

10 У додатковому аспекті даний винахід відноситься до застосування ферменту згідно з даним винаходом, або препарату згідно з даним винаходом, або композиції згідно з даним винаходом для одержання злакових компонентів. У деяких варіантах здійснення злак являє собою жито, пшеницю або ячмінь.

15 У додатковому аспекті даний винахід відноситься до застосування ферменту згідно з даним винаходом, або препарату згідно з даним винаходом, або композиції згідно з даним винаходом при одержанні пива або модифікації побічних продуктів з процесу пивоваріння.

У додатковому аспекті даний винахід відноситься до застосування ферменту згідно з даним винаходом, або препарату згідно з даним винаходом, або композиції згідно з даним винаходом при одержанні вина або соку.

20 У додатковому аспекті даний винахід відноситься до застосування ферменту згідно з даним винаходом, або препарату згідно з даним винаходом, або композиції згідно з даним винаходом при одержанні біопалива першого або другого покоління, наприклад, біоетанолу.

У додатковому аспекті даний винахід відноситься до способу зміни фільтрувальності крохмаломісткого матеріалу, причому зазначений спосіб включає етап обробки зазначеного крохмаломісткого матеріалу ферментом, або препаратом, або композицією згідно з даним винаходом.

25 У додатковому аспекті даний винахід відноситься до способу зменшення підвищення тиску під час фільтрування пивного сусла у пивоварінні, причому зазначений спосіб включає етап обробки пивного затору ферментом, або препаратом, або композицією згідно з даним винаходом.

У додатковому аспекті даний винахід відноситься до способу одержання харчового продукту, кормового продукту або продукту-напою, наприклад, спиртного або безалкогольного напою, наприклад, напою на основі злаку або на основі солоду, наприклад, пива або віскі, причому зазначений спосіб включає етап обробки крохмаломісткого матеріалу ферментом, або препаратом, або композицією згідно з даним винаходом.

35 У додатковому аспекті даний винахід відноситься до способу одержання пивного затору, причому зазначений спосіб включає етап обробки крохмаломісткого матеріалу ферментом, або препаратом, або композицією згідно з даним винаходом.

40 У додатковому аспекті даний винахід відноситься до способу одержання біопалива першого або другого покоління, наприклад, біоетанолу, причому зазначений спосіб включає етап обробки крохмаломісткого матеріалу ферментом, або препаратом, або композицією згідно з даним винаходом.

У додатковому аспекті даний винахід відноситься до продукту, одержаного за допомогою способу згідно з даним винаходом.

45 У додатковому аспекті даний винахід відноситься до композиції, що містить продукт, одержаний за допомогою способу згідно з даним винаходом, наприклад, у якій даний продукт присутній у діапазоні 0,1%-99,9%.

КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

50 Фіг. 1. Профіль затирання, використований при пивоварінні у лабораторному масштабі та у напівпромисловому масштабі. Затирання починали з 10 хв. періоду початку затирання, після чого додавали фермент.

Фіг. 2. Результати пивоваріння у напівпромисловому масштабі, виходячи з підтвердження скринінгу глюканази та ксиланаз. Глюканазу S B. sub у комбінації із ксиланазами A. tub тестували у порівнянні з холостою пробою і UltraFlo max. Зібрані дані являли собою середній потік (л/година), загальне підвищення тиску протягом фільтрування пивного сусла (мм WC, де 1 мм WC = 9,80665 Па) і зафіксований максимальний тиск під час фільтрування пивного сусла (мм WC).

Фіг. 3. Функціональні властивості ксиланаз у пивоварінні.

60 Фіг. 4. Потік - фільтрування пивного сусла із застосуванням різних ксиланазних кандидатів.

Фіг. 5. Фільтрація пива - середнє з повторних фільтрацій.

Фіг. 6. Фільтрація пива - середнє з повторних фільтрацій.

Фіг. 7. Діаграма затирання із прикладу 3.

ДЕТАЛЬНЕ РОЗКРИТТЯ ВИНАХОДУ

5 Традиційно, пивом називають спиртний напій, одержаний із солоду, наприклад, солоду, одержаного з ячмінного зерна, і необов'язково добавки, такої як крохмаломісткий рослинний матеріал (наприклад, зерна злаку), і необов'язково з доданим смаком і запахом, наприклад, за допомогою шишок хмелю.

10 У контексті даного винаходу вираз "пиво" слід розуміти як такий, що охоплює будь-яке зброжене сусло, одержане за допомогою збродження/пивоваріння із крохмаломісткого рослинного матеріалу, таким чином, зокрема, також пиво, одержане винятково із добавки або будь-якої комбінації солоду і добавки.

15 Вираз "збродження" у даному контексті означає одержання речовини, наприклад, етанолу, за допомогою вирощування мікроорганізмів у культурі. Зазвичай для збродження використовують мікроорганізми, наприклад, дріжджі.

Використовуваний у даному документі вираз "солод" слід розуміти як такий, що охоплює будь-яке осолоджене зерно злаку, наприклад, солоджений ячмінь. "Добавка" може бути визначена як будь-який крохмаломісткий рослинний матеріал, який не відноситься до солоду або ячмінного солоду.

20 "Крохмаломісткий рослинний матеріал", наприклад, може являти собою один або декілька злаків, наприклад, ячмінь, пшениця, маїс, жито, сорго, просо або рис та будь-яку їх комбінацію. Крохмаломісткий рослинний матеріал може бути обробленим, наприклад, меленим, солодженим, частково солодженим або неосолодженим. Неосолоджений злак також називають "сировинне зерно". Приклади крохмаломісткого рослинного матеріалу, що не відноситься до

25 злаку, включають, наприклад, бульби, наприклад, різновиди картоплі та маніок.

Використовувані у даному документі вирази "напій" і "продукт-напій (продукти-напої)" охоплюють такі піноутворювальні зброжені напої, як солодове пиво, пиво, зварене згідно "Закону про чистоту пива", ель, сухе пиво, "майже пиво", легке пиво, слабоалкогольне пиво, низькокалорійне пиво, портер, бок-бір, стаут, солодовий напій, безалкогольне пиво, безалкогольний солодовий напій тощо. Вираз "напої" або "продукти-напої" також охоплює пиво, що не відноситься до піноутворювального, і альтернативні солодові напої, такі як солодові напої зі смаком і запахом фруктів, наприклад, смаком і запахом цитрусових, наприклад, солодові напої зі смаком і запахом лимона, апельсина, лайма або ягід, солодові напої зі смаком і запахом спиртного напою, наприклад, солодовий напій зі смаком і запахом горілки, рому або текили, або

35 солодові напої зі смаком і запахом кави, наприклад, солодовий напій зі смаком і запахом кофеїну тощо.

Пиво можна одержати із різноманітного крохмаломісткого рослинного матеріалу за допомогою практично одного й того ж процесу, у якому крохмаль, головним чином, складається з гомополімерів глюкози, у яких залишки глюкози зв'язані або альфа-1,4-, або альфа-1,6-

40 зв'язками, причому перші є переважними.

Процес одержання зброжених напоїв, таких як пиво, зазвичай називається пивоварінням Традиційними сировинними матеріалами, використовуваними при одержанні даних напоїв, є вода, шишки хмелю й солод. Крім або замість солоду, добавки, такі як звичайна кукурудзяна крупа, очищена кукурудзяна крупа, подрібнені пивні дріжджі, рис, сорго, очищений кукурудзяний крохмаль, ячмінь, ячмінний крохмаль, ячмінь із видаленою полов'яною оболонкою, пшениця, пшеничний крохмаль, повітряний злак, пластівці злаку, жито, овес, картопля, тапіока та сиропи, такі як кукурудзяний сироп, сироп із цукрової тростини, інвертний цукровий сироп, ячмінний та/або пшеничний сиропи тощо, можна використовувати в якості джерела крохмалю. У підсумку, під впливом ферментів крохмаль буде перетворений у цукри, що зброджуються.

50 Що стосується видів пива, одержаних переважно із солоду (наприклад, з добавкою до 15-20%), з ряду причин, солод, який в основному одержують з вибраних сортів ячменю, справляє найбільший ефект на загальний характер і якість пива. По-перше, солод являє собою основну ароматизуючу речовину в пиві. По-друге, солод забезпечує більшу частину цукру, що зброджується. По-третє, солод забезпечує білки, які будуть впливати на тіло й характер піни пива. По-четверте, солод забезпечує необхідну ферментативну активність під час затирання.

55 Шишки хмелю також у значній мірі впливають на якість пива, у тому числі надання смаку й запаху. Зокрема, за допомогою шишок хмелю (або складових шишок хмелю) додають необхідні гіркі речовини до пива. Крім того, шишки хмелю виступають у якості осаджувачів білка, забезпечують консервуючі речовини та сприяють утворенню і стабілізації піни. Не всі види пива

60 одержують із застосуванням шишок хмелю. Також можна використовувати інші стабілізуючі

речовини, такі як протеази (наприклад, папаїн).

Не бажаючи тлумачити це як обмеження даного винаходу, звичайний процес пивоваріння можна описати наступним чином.

Процес одержання пива є добре відомим у даній галузі техніки, але стисло, він включає п'ять етапів: (a) затирання та/або розварювання добавки; (b) відділення та екстракція сусла; (c) кип'ятіння та охмеління сусла; (d) охолодження, зброджування та зберігання та (e) дозрівання, обробка і пакування. Типово, на першому етапі мелений або подрібнений солод змішують з водою і витримують протягом періоду часу при регульованих температурах для того, щоб дати можливість ферментам, що присутні у солоді, перетворити крохмаль, який присутній у солоді, на цукри, що зброджуються.

На другому етапі затор переміщують у "фільтраційний чан" або заторний фільтр, де рідину відокремлюють від залишку зерна. Цю солодку рідину називають "сусло", а залишок зерна називають "дробина". Типово, затор піддають екстракції, яка включає додавання води до затору для витягнення залишкового розчинного екстракту із дробини.

На третьому етапі сусло енергійно кип'ятять. Це забезпечує стерилізацію сусла та сприяє утворенню кольору, смаку і запаху. Шишки хмелю додають у певний момент під час кип'ятіння.

На четвертому етапі сусло охолоджують і переміщують у бродильний чан, який або містить дріжджі, або у який дріжджі додають. Дріжджі перетворюють цукри шляхом зброджування у спирт і вуглекислий газ; при цьому наприкінці зброджування бродильний чан охолоджують, або бродильний чан можна охолоджувати для припинення зброджування. Пластівці дріжджів видаляють.

На останньому етапі пиво охолоджують і зберігають протягом періоду часу, протягом якого пиво стає прозорим і його смак поліпшується, і будь-який матеріал, який може погіршити зовнішній вигляд, смак і строк зберігання пива, випадає в осад. Перед пакуванням пиво насичують вуглекислим газом і, необов'язково, фільтрують і пастеризують.

Після зброджування одержують напій, який звичайно містить від приблизно 2% до приблизно 10% спирту по вазі. Вуглеводи, що не зброджуються, не перетворюються під час зброджування й утворюють більшу частину розчинених твердих речовин у кінцевому пиві.

Цей залишок залишається через нездатність солодових амілаз гідролізувати альфа-1,6-зв'язки крохмалю. Вуглеводи, що не зброджуються, привносять приблизно 50 калорій на 12 унцій пива.

Останнім часом проводилася широка популяризація пивних напоїв, які називають легкими видами пива, видами пива зі зниженою калорійністю або низькокалорійними видами пива, зокрема, на ринку Сполучених Штатів. Згідно з визначенням, прийнятим у Сполучених Штатах, ці види пива містять на приблизно 30% менше калорій, ніж "нормальне" пиво від виробника.

Додаткову інформацію, що відноситься до традиційних процесів пивоваріння, а також визначення для виразів, використовуваних в галузі, пов'язаних з технологією пивоваріння, які застосовуються для цілей даного винаходу, можна знайти в "Technology Brewing and Malting" by Wolfgang Kunze of the Research and Teaching Institute of Brewing, Berlin (VLB), 2nd revised Edition 1999, ISBN 3-921690-39-0, 3rd edition (2004): ISBN 3-921690-49-8, 4th updated edition, 2010 (ISBN 978-3-921690-64-2).

Ксиланази віднесено до ЕС 3.2.1.8, ЕС 3.2.1.32, ЕС 3.2.1.136 і ЕС 3.2.1.156; причому їх активність можна виміряти, наприклад, як описано в прикладах. Ксиланази, що підходять для застосування у комбінації з ферментом, що характеризується ендо-1,3(4)-β-глюканазою активністю, згідно з даним винаходом включають будь-яку ксиланазу, віднесено до ЕС 3.2.1.8, ЕС 3.2.1.32, ЕС 3.2.1.136 і ЕС 3.2.1.156, наприклад, будь-яку ксиланазу, розкриту в патентних документах WO 2010072226, WO 2010072225, WO 2010072224, WO 2005059084, WO2007056321, WO2008023060A, WO9421785, WO2006114095, WO2006066582, US 2008233175 і WO10059424.

Ендо-1,4-бета-ксиланазу віднесено до ЕС 3.2.1.8. Фермент викликає ендогідроліз 1,4-D-ксилозидних зв'язків у ксиланах.

Вирази "ксиланазу родини 11", "глікозидгідролаза (GH) родини 11" або просто "ксиланазу GH 11", використовувані у даному документі, відносяться до ендо-1,4-бета-ксиланазу, віднесеної до ЕС 3.2.1.8, яка викликає ендогідроліз 1,4-бета-D-ксилозидних зв'язків у ксиланах і яку віднесено до ксиланазу родини 11 згідно В. Henrissat, A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 280 (1991), pp. 309-316.

Вирази "ксиланазу родини 10", "глікозидгідролаза (GH) родини 10" або просто "ксиланазу GH 10" охоплюють ферменти з рядом відомих активностей, наприклад, ксиланазу (ЕС:3.2.1.8); ендо-1,3-бета-ксиланазу (ЕС:3.2.1.32); целобіогідролазу (ЕС:3.2.1.91). Ці ферменти раніше були відомі як целюлаза родини F.

У деяких варіантах здійснення фермент, що характеризується ендо-1,4- β -ксиланазною активністю, являє собою ксиланазу родини 11. У деяких варіантах здійснення фермент, що характеризується ендо-1,4- β -ксиланазною активністю, являє собою ксиланазу родини 10.

В одному аспекті ферментна композиція згідно з даним винаходом має ендо-1,4-бета-ксиланазну активність, виміряну за допомогою дослідження, описаного у прикладах.

Дослідження для вимірювання ксиланазної активності можна здійснювати при рН 3,5 або рН 5 і 50 °С з використанням ксилану в якості субстрату, або його можна проводити при різних значеннях рН і температури для додаткової характеристики й опису ферментів. Ферментну активність розраховують виходячи із збільшення поглинання, обумовленого ксилозою, при 540 нм за одиницю часу.

У деяких варіантах здійснення ферментна композиція згідно з даним винаходом містить ксиланазну активність щонайменше приблизно 5000 од./г, наприклад, щонайменше приблизно 6000 од./г, наприклад, щонайменше приблизно 7000 од./г, наприклад, щонайменше приблизно 8000 од./г, наприклад, щонайменше приблизно 8500 од./г, виміряну за допомогою дослідження, описаного у прикладах.

Ферментна композиція згідно з даним винаходом може мати целюлолітичну активність. Систематичною назвою целюлози є 4-(1,3;1,4)- β -D-глюкан-4-глюканогідролаза, і при цьому целюлолітичні ферменти або целюлази віднесено до ЕС 3.2.1.4. Целюлаза здійснює ендогідроліз (1 \rightarrow 4)- β -D-глюкозидних зв'язків, наприклад, у целюлозі, ліхеніні та β -D-глюканах злаків, а також буде гідролізувати 1,4-зв'язки в β -D-глюканах, що також містять 1,3-зв'язки. Целюлаза також може мати інші назви, наприклад, ендо-1,4- β -D-глюканаза, β -1,4-глюканаза, β -1,4-ендоглюканогідролаза, целюлаза А, целюлозин АР, ендоглюканаза D, лужна целюлоза, целюлаза А 3, целюлодекстриназа, целюлаза 9.5, авіцелаза, панцелаза SS і 1,4-(1,3;1,4)- β -D-глюкан-4-глюканогідролаза.

В одному аспекті даного винаходу целюлазну активність ферментної композиції згідно з даним винаходом вимірюють за допомогою "способу для целюлазної активності", як описано нижче під заголовком "Дослідження".

У додаткових аспектах даний винахід відноситься до ферментів, що мають ендо-1,3(4)- β -глюканазну активність, визначену за допомогою дослідження, описаного у прикладах.

" β -глюканаза" або "бета-глюканаза", як використовується у даному документі, відноситься до ендо-1,3(4)-бета-глюканази з ЕС 3.2.1.6. Каталізує ендогідроліз (1 \rightarrow 3)- або (1 \rightarrow 4)-зв'язків у бета-D-глюканах, якщо залишок глюкози, група, що відновлює, якого бере участь у зв'язку, що підлягає гідролізу, сам заміщений по С-3. Бета-глюканази, що придатні для застосування у комбінації з ферментом, що характеризується ендо-1,4- β -ксиланазною активністю, згідно з даним винаходом включають будь-яку бета-глюканазу, розкрити у патентних документах WO2004087889, WO2005059084, WO9414953, WO2007056321, WO9531533, WO08023060, WO2005100582, WO9828410, WO9742301, WO2006066582, WO05118769, WO2005003319 і WO10059424.

Стандартне дослідження здійснюють при рН 5,0, і його можна проводити при різних значеннях рН для додаткової характеристики і опису ферментів.

Одну одиницю ендо-1,3(4)- β -глюканазної активності визначають як кількість ферменту, яка утворює 1 мкмоль еквівалентів глюкози за хвилину за умов дослідження (рН 5,0 (або як зазначено) і 50 °С).

У деяких варіантах здійснення ферментна композиція згідно з даним винаходом містить β -глюканазну активність щонайменше приблизно 10000 од./г, наприклад, щонайменше приблизно 12000 од./г, наприклад, щонайменше приблизно 14000 од./г, наприклад, щонайменше приблизно 15000 од./г, наприклад, щонайменше приблизно 18000 од./г, виміряну за допомогою дослідження, описаного у прикладах.

У додаткових аспектах ферментна композиція згідно з даним винаходом має ламінариазну активність або містить будь-який один або декілька додаткових ферментів, що мають ламінариазну активність. Ламінариазну активність визначають, як описано у дослідженні ламінарази, описаному у розділі Дослідження.

Ламінариназа може являти собою ендо-1,3(4)-бета-глюканазу, віднесено до Е.С. 3.2.1.6, або глюкан-ендо-1,3-бета-D-глюкозидазу, віднесено до Е.С. 3.2.1.39. Ендо-1,3(4)-бета-глюканаза, з альтернативними назвами ламінариназа, ендо-1,3-бета-глюканаза, ендо-1,4-бета-глюканаза, віднесена до Е.С. 3.2.1.6. Субстрати включають ламінарин, ліхенін та D-глюкани злаків, і при цьому фермент каталізує ендогідроліз (1 \rightarrow 3)- або (1 \rightarrow 4)-зв'язків у бета-D-глюканах, якщо залишок глюкози, група, що відновлює, якого бере участь у зв'язку, що підлягає гідролізу, сам заміщений по С-3. Глюкан-ендо-1,3-бета-D-глюкозидаза, з альтернативними назвами (1 \rightarrow 3)-бета-глюкан-ендогідролаза, ендо-1,3-бета-глюканаза та ламінариназа, віднесена до Е.С.

3.2.1.39 і гідролізує (1->3)-бета-D-глюкозидні зв'язки в (1->3)-бета-D-глюканах у субстратах, таких як, наприклад, ламінарин, парамілон і пахіман.

У деяких аспектах ферментна композиція згідно з даним винаходом має арабіназну активність або містить додатковий фермент, що має арабіназну активність. Арабіназу віднесено до ЕС 3.2.1.99. Систематичною назвою є 5- α -L-арабінан-5- α -арабінангідролаза, але вона має декілька інших назв, таких як арабінан-ендо-1,5- α -L-арабінозидаза та ендо-1,5- α -L-арабіназа, ендо- α -1,5-арабаназа, ендорабаназа, 1,5- α -L-арабінан- та 1,5- α -L-арабінангідролаза. Арабіназа здійснює ендогідроліз (1 \rightarrow 5)- α -арабінофуранозидних зв'язків в (1 \rightarrow 5)-арабінахах. Арабіназа також справляє дію на арабінан.

В одному аспекті даного винаходу арабіназну активність ферментної композиції згідно з даним винаходом вимірюють за допомогою дослідження арабінази, як описано нижче під заголовком "Дослідження". Дослідження можна здійснювати при рН 3,5 і 50 °С з використанням арабінану із цукрового буряка як субстрату, і його можна проводити при різних значеннях рН і температури для додаткової характеристики та опису ферментів. Ферментну активність розраховують виходячи зі збільшення поглинання при 540 нм за одиницю часу.

Одну одиницю арабіназної активності визначають як кількість ферменту (нормалізовану для загального обсягу дослідження), яка дає збільшення $\Delta OD_{540nm} \cdot x \cdot v^{-1}$ за умов дослідження (рН 3,5 і 50 °С).

У деяких аспектах ферментна композиція згідно з даним винаходом має бета-D-глюкозидглюкогідролазну активність або містить додатковий фермент, що має бета-D-глюкозидглюкогідролазну активність. Бета-D-глюкозидглюкогідролаза відноситься до ферментів з Е.С 3.2.1.21.

У деяких аспектах ферментна композиція згідно з даним винаходом має β -ксилозидазну активність або містить додатковий фермент, що має β -ксилозидазну активність. " β -ксилозидаза" або "ксилан-1,4-бета-ксилозидаза" відноситься до ферментів з Е.С 3.2.1.37. β -ксилозидаза каталізує гідроліз (1->4)-бета-D-ксиланів з видаленням послідовних залишків D-ксилози з кінця, що не відновлює.

У деяких аспектах даного винаходу ферментна композиція згідно з даним винаходом має целобіогідролазну активність або містить додатковий фермент, що має целобіогідролазну активність. "Целобіогідролаза" або "1,4-бета-целобіозидаза целюлози" відноситься до ферментів з ЕС 3.2.1.91. 1,4-бета-целобіозидаза целюлози каталізує гідроліз 1,4-бета-D-глюкозидних зв'язків у целюлозі та целотетраозі з вивільненням целобіози з кінців ланцюгів, що не відновлюють.

Целобіогідролазну активність ферментної композиції згідно з даним винаходом вимірюють за допомогою дослідження целобіогідролази, як описано нижче під заголовком "Дослідження". Стандартне дослідження здійснюють при рН 5,0, і його можна проводити при різних значеннях рН для додаткової характеристики та опису ферментів.

Одну одиницю целобіогідролазної активності визначають як кількість ферменту, яка утворює 1 мкмоль п-нітрофенолу з п-нітрофеніл- β -D-целобіопіранозиду за хвилину за умов дослідження (рН 5,0 (або як зазначено) і 50 °С).

У деяких аспектах ферментна композиція згідно з даним винаходом має α -N-арабінофуранозидазну активність або містить додатковий фермент, що має арабінофуранозидазну активність. " α -N-арабінофуранозидаза" або "альфа-N-арабінофуранозидаза" відноситься до ферментів з ЕС 3.2.1.55. α -N-арабінофуранозидаза каталізує гідроліз кінцевих альфа-L-арабінофуранозидних залишків, що не відновлюють, в альфа-L-арабінозидах.

В одному аспекті даного винаходу арабінофуранозидазну активність ферментної композиції згідно з даним винаходом вимірюють за допомогою дослідження арабінофуранозидази, як описано нижче під заголовком "Дослідження". Стандартне дослідження можна здійснювати при рН 5,0 і 50 °С і його можна проводити при різних значеннях рН і температури для додаткової характеристики та опису ферментів.

Одну одиницю α -N-арабінофуранозидазної активності визначають як кількість ферменту, яка утворює 1 мкмоль п-нітрофенолу з п-нітрофеніл- α -L-арабінофуранозиду за хвилину за умов дослідження (рН 5,0 і 50 °С (або як зазначено)).

У деяких аспектах ферментна композиція згідно з даним винаходом має глюкан-1,4-бета-глюкозидазну активність або містить додатковий фермент, що має глюкан-1,4-бета-глюкозидазну активність. "Глюкан-1,4-бета-глюкозидаза" або "глюкан-1,4-бета-глюкозидаза" відноситься до ферментів з Е.С 3.2.1.74. Глюкан-1,4-бета-глюкозидаза каталізує гідроліз (1->4)-зв'язків в (1->4)-D-глюканах з видаленням послідовних глюкозних елементарних ланок.

У деяких аспектах ферментна композиція згідно з даним винаходом має ксилглюкан-

специфічну екзо-бета-1,4-глюканазну активність або містить додатковий фермент, що має ксилоглюкан-специфічну екзо-бета-1,4-глюканазну активність. "Ксилоглюкан-специфічна екзо-бета-1,4-глюканаза" відноситься до ферментів з E.C.3.2.1.155. Ксилоглюкан-специфічна екзо-бета-1,4-глюканаза каталізує екзогідроліз (1->4)-бета-D-глюкозидних зв'язків у ксилоглюкані.

5 Ферменти і ферментні композиції згідно з попередніми аспектами можна використовувати у способі, що передбачає зниження в'язкості водного розчину, що містить гідролізат крохмалю.

Ферменти і ферментні композиції також можна використовувати у способі, що передбачає фільтрацію водного розчину, що містить гідролізат крохмалю. У деяких варіантах здійснення водний розчин, що містить гідролізат крохмалю, являє собою затор для одержання пива, і в інших варіантах здійснення водний розчин, що містить гідролізат крохмалю, являє собою харчову композицію.

10 В альтернативному випадку, ферментну композицію згідно з даним винаходом можна використовувати при одержанні плодово-ягідного соку, вина, обробці зерна, одержанні паливного спирту, біопалива першого або другого покоління, наприклад, біоетанолу, і харчового спирту.

У деяких варіантах здійснення біопаливо першого або другого покоління, наприклад, біоетанол, одержують із різновидів сільськогосподарської сировини, наприклад, цукрової тростини, картоплі, кукурудзи, пшениці, сорго тощо, або із целюлозного матеріалу, наприклад, кукурудзяної соломи, проса прутоподібного або іншого рослинного матеріалу. В обох випадках цукри, що зброджуються, екстрагують із сировинного матеріалу та здійснюють зброджування за допомогою мікроорганізмів з одержанням спирту, який піддають перегонці, і його можна використовувати в якості транспортного палива. Ферментну композицію згідно з даним винаходом можна використовувати при такому одержанні біопалива. Ферментний комплекс можна додавати для того, щоб поліпшити екстракцію полісахаридів із сировинного матеріалу, сприяти розщепленню полісахаридів до цукрів, що зброджуються, та/або для того, щоб поліпшити параметри обробки, наприклад, відділення рідин від твердих речовин, характеристики потоку та перекачуваність.

Спосіб за даним винаходом можна застосовувати при затиранні будь-якої крупки. Згідно з даним винаходом крупка може містити будь-який рослинний матеріал, що містить крохмаль та/або цукор, одержуваний з будь-якої рослини й частини рослини, у тому числі бульб, коріння, стебла, листя і насіння.

У деяких варіантах здійснення крупка містить зерно, наприклад, зерно ячменю, пшениці, жита, вівса, кукурудзи, рису, майла, проса й сорго, і більш переважно щонайменше 10% або більш переважно щонайменше 15%, навіть більш переважно щонайменше 25%, або найбільш переважно щонайменше 35%, наприклад, щонайменше 50%, щонайменше 75%, щонайменше 90% або навіть 100% (ваг./ваг.) крупки для сусла одержують із зерна.

У деяких варіантах здійснення крупка містить осолоджене зерно, наприклад, ячмінний солод. Переважно щонайменше 10% або більше переважно щонайменше 15%, навіть більше переважно щонайменше 25%, або найбільш переважно щонайменше 35%, наприклад, щонайменше 50%, щонайменше 75%, щонайменше 90% або навіть 100% (ваг./ваг.) крупки для сусла одержують із осолодженого зерна.

Вираз "затор" передбачає водну крохмальну суспензію, наприклад, таку, що містить подрібнений ячмінний солод, подрібнений ячмінь, та/або іншу добавку, або їх комбінацію, причому вона змішана з водою і надалі підлягає розділенню на сусло + дробину.

45 Вираз "розділення затору" передбачає відділення сусла від дробини, наприклад, за допомогою фільтрування пивного сусла або фільтрації затору.

Вираз "фільтрація пива" передбачає процес розділення, при якому видаляють дріжджові клітини та інші матеріали, що викликають помутніння, які усе ще присутні у пиві, наприклад, за допомогою мікрофільтрації або мембранних процесів.

50 Ферментний препарат, наприклад, у формі харчового інгредієнта, одержаного згідно з даним винаходом, може перебувати у формі розчину або у вигляді твердої речовини - залежно від використання, та/або способу застосування, та/або способу введення. Тверда форма може бути або у вигляді висушеного ферментного порошку, або у вигляді гранульованого ферменту.

В одному аспекті даний винахід забезпечує препарат на основі ферментної композиції, що містить фермент, або ферментну композицію згідно з даним винаходом, носій ферменту, і необов'язково стабілізатор, і/або консервант.

У ще одному аспекті даного винаходу носій ферменту вибраний з групи, що складається з гліцерину або води.

60 У додатковому аспекті препарат містить стабілізатор. В одному аспекті стабілізатор вибраний з групи, що складається з неорганічних солей, багатоатомних спиртів, цукрів та їх

комбінацій. В одному аспекті стабілізатор являє собою неорганічну сіль, наприклад, хлорид калію. В іншому аспекті багатоатомний спирт являє собою гліцерин, пропіленгліколь або сорбіт. У ще одному аспекті цукор являє собою низькомолекулярний вуглевод, зокрема, будь-який з декількох вуглеводів із солодким смаком, таких як глюкоза, фруктоза і сахароза.

5 У ще одному аспекті препарат містить консервант. В одному аспекті консервант являє собою метилпарабен, пропілпарабен, бензоат, сорбат, або інші консерванти, дозволені для застосування у харчових продуктах, або їх суміш.

Конкретні варіанти здійснення даного винаходу

10 У деяких варіантах здійснення фермент, який характеризується ендо-1,4- β -ксиланазною активністю, необов'язково у комбінації з будь-якою однією або декількома β -глюканазами, згідно з даним винаходом забезпечує значно знижену в'язкість у пивоварінні, що полегшує поліпшене розділення затору та відділення пива.

Необхідні характеристики ксиланаз для пивоваріння можуть включати один або декілька з наступних аспектів.

15 а) Субстратна специфічність ферменту.

Співвідношення WE-AX/WU-AX впливає на в'язкість. У деяких варіантах здійснення дане співвідношення становить менше приблизно 7,0, наприклад, менше приблизно 6,5, наприклад, менше приблизно 6,0, наприклад, менше приблизно 5,5, наприклад, менше приблизно 5,0, наприклад, менше приблизно 4,5.

20 б) Вибірковість ферменту щодо субстрату.

Вважається, що те, наскільки близько до точок розгалуження фермент(и) здійснюють розрізання, впливає на функціональні властивості.

с) Термостабільність ферменту.

25 При тривалому розчиненні AX під час затирання термостабільність є ключовою властивістю. Відповідно, у деяких варіантах здійснення фермент, який характеризується ендо-1,4- β -ксиланазною активністю, згідно з даним винаходом є термостабільним у межах температурного діапазону 65-78 °C.

д) Оптимальне значення рН для ферменту. Відповідно, у деяких варіантах здійснення фермент, який характеризується ендо-1,4- β -ксиланазною активністю, має оптимальне значення рН у діапазоні рН 5,4-5,6.

е) Інгібування ферменту (наприклад, відомий ключовий фактор для ксиланаз).

Зазначену значно знижену в'язкість у пивоварінні можна виміряти як знижену в'язкість у пивоварінні у порівнянні з контролем з відомим ферментом або комбінацією ферментних активностей, наприклад, Ultraflo® Max, що використовується за таких же умов і кількостей.

35 У деяких варіантах здійснення фермент, який характеризується ендо-1,4- β -ксиланазною активністю, згідно з даним винаходом, необов'язково у комбінації з будь-якою однією або декількома β -глюканазами згідно з даним винаходом забезпечує поліпшене розділення затору та відділення пива у пивоварінні.

40 У деяких варіантах здійснення фермент, який характеризується ендо-1,4- β -ксиланазною активністю, згідно з даним винаходом, необов'язково у комбінації з будь-якою однією або декількома β -глюканазами згідно з даним винаходом забезпечує низьку можливість утворення стороннього присмаку, наприклад, утворення стороннього присмаку, пов'язаного з розпадом арабіноксиланів.

45 У деяких варіантах здійснення фермент, який характеризується ендо-1,4- β -ксиланазною активністю, згідно з даним винаходом, необов'язково у комбінації з будь-якою однією або декількома β -глюканазами згідно з даним винаходом забезпечує знижений ризик руйнування фільтрувального шару, наприклад, при фільтруванні пивного суслу.

50 У деяких варіантах здійснення фермент, який характеризується ендо-1,4- β -ксиланазною активністю, згідно з даним винаходом, необов'язково у комбінації з будь-якою однією або декількома β -глюканазами згідно з даним винаходом забезпечує зниження можливості стороннього присмаку та/або зниження утворення стороннього присмаку. Один аспект даного винаходу відноситься до ферменту, який характеризується ендо-1,4- β -ксиланазною активністю, причому даний фермент містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 80% ідентичність із будь-якою послідовністю, вибраною з 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 і SEQ ID NO:18 або їх будь-якого функціонального фрагмента.

60 Інший аспект відноситься до ферменту, який характеризується ендо-1,3(4)- β -глюканазною активністю, причому даний фермент містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 80% ідентичність з будь-якою послідовністю, вибраною з SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID

NO:15, SEQ ID NO:16 або їх будь-якого функціонального фрагмента.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу фермент, який характеризується ендо-1,4-β-ксиланазною активністю, має співвідношення активності щодо розчинного арабіноксиланового субстрату (WE-AX) і нерозчинного арабіноксиланового субстрату (WU-AX), які відносяться до арабіноксиланового субстрату, менше приблизно 7,0, наприклад, менше приблизно 6,5, наприклад, менше приблизно 6,0, наприклад, менше приблизно 5,5, наприклад, менше приблизно 5,0, наприклад, менше приблизно 4,5.

У деяких варіантах здійснення фермент згідно з даним винаходом характеризується оптимальним значенням температури в діапазоні 40-70 °С, наприклад, у діапазоні 45-65 °С, наприклад, у діапазоні 50-65 °С, наприклад, у діапазоні 55-65 °С.

У деяких варіантах здійснення фермент згідно з даним винаходом має щонайменше 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99% ідентичність з будь-якою амінокислотою послідовністю, вибраною з SEQ ID NO: 1-18 або їх будь-якого функціонального фрагмента.

У деяких варіантах здійснення фермент згідно з даним винаходом має загальну кількість амінокислот менше 350, наприклад, менше 340, наприклад, менше 330, наприклад, менше 320, наприклад, менше 310, наприклад, менше 300 амінокислот, наприклад, у діапазоні 200-350, наприклад, у діапазоні 220-345 амінокислот.

У деяких варіантах здійснення амінокислотна послідовність зазначеного ферменту згідно з даним винаходом має щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять або десять амінокислотних замінів у порівнянні з будь-якою амінокислотою послідовністю, вибраною з SEQ ID NO: 1-18 або їх будь-якого функціонального фрагмента.

У деяких варіантах здійснення амінокислотна послідовність зазначеного ферменту згідно з даним винаходом має максимум одну, дві, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять або десять амінокислотних замінів у порівнянні з будь-якою амінокислотою послідовністю, вибраною з SEQ ID NO: 1-18 або їх будь-якого функціонального фрагмента.

У деяких варіантах здійснення фермент згідно з даним винаходом містить амінокислотну послідовність, визначену у будь-якій із SEQ ID NO: 1-18 або їх будь-якому функціональному фрагменті.

У деяких варіантах здійснення фермент згідно з даним винаходом складається з амінокислотної послідовності, визначеної у будь-якій із SEQ ID NO: 1-18 або їх будь-якому функціональному фрагменті.

Додатковий важливий аспект даного винаходу відноситься до композиції, що містить фермент, який характеризується ендо-1,4-β-ксиланазною активністю, згідно з даним винаходом у комбінації з будь-якою однією або декількома β-глюканазами. У деяких варіантах здійснення дана одна або декілька β-глюканаз є такою(такими) згідно з даним винаходом.

Додатковий важливий аспект даного винаходу являє собою композицію, що містить фермент, який характеризується ендо-1,3(4)-β-глюканазною активністю, згідно з даним винаходом у комбінації з будь-якою однією або декількома ксиланазами. У деяких варіантах здійснення дана одна або декілька ксиланаз являє(являють) собою фермент, який характеризується ендо-1,4-β-ксиланазною активністю, згідно з даним винаходом. У деяких варіантах здійснення дана одна або декілька ксиланаз являє(являють) собою фермент згідно SEQ ID NO:17, та/або SEQ ID NO:18, або їх будь-якому функціональному фрагменту.

У деяких варіантах здійснення комбінація ферменту, який характеризується ендо-1,4-β-ксиланазною активністю, з ферментом, який характеризується ендо-1,3(4)-β-глюканазною активністю, являє собою таку згідно з наступною таблицею.

1-ий фермент (ксиланаза) 2-ий фермент (глюканаза)	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

1-ий фермент (ксиланаза) 2-ий фермент (глюканаза)	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:16	X	X	X	X	X	X	X	X

Потрібно розуміти, що у будь-якій наведеній вище комбінації 1-ий фермент, який являє собою фермент, що характеризується ендо-1,4- β -ксиланазною активністю, може бути у комбінації з одним ферментом, який характеризується ендо-1,3(4)- β -глюканазною активністю, причому співвідношення двох ферментів являє собою 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 або 10:1, наприклад, у межах діапазону 1:10-10:1, наприклад, 2:10-10:2, наприклад, 3:10-10:3, наприклад, 4:10-10:4, наприклад, 5:10-10:5, наприклад, 6:10-10:6, наприклад, 7:10-10:7, наприклад, 8:10-10:8, або у межах 9:10-10:9.

У деяких варіантах здійснення композиція згідно з даним винаходом містить комбінацію щонайменше з двох ферментів, причому зазначені два ферменти або два ферменти з амінокислотною послідовністю, що має щонайменше 80% ідентичність послідовності з відповідною SEQ ID або її будь-яким функціональним фрагментом, вибрані з переліку, що складається з

SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:7;

SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:7;

SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:7;

SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:7;

SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:7;

SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:7;

SEQ ID NO:17 и SEQ ID NO:7;

SEQ ID NO:18 и SEQ ID NO:7;

SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:8;

SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:8;

SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:8;

SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:8;

SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:8;

SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:8;

SEQ ID NO:17 и SEQ ID NO:8;

SEQ ID NO:18 и SEQ ID NO:8;

SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:9;

SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:9;

SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:9;

SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:9;

SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:9;

SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:9;

SEQ ID NO:17 и SEQ ID NO:9;

SEQ ID NO:18 и SEQ ID NO:9;

SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:10;

SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:10;

SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:10;

SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:10;

SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:10;

SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:10;

SEQ ID NO:17 и SEQ ID NO:10;

SEQ ID NO:18 и SEQ ID NO:10;

SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:11;

SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:11;

SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:11;

SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:11;

SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:11;

SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:11;

SEQ ID NO:17 и SEQ ID NO:11;

SEQ ID NO:18 и SEQ ID NO:11;

SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:12;

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

У деяких варіантах здійснення ендо-1,3(4)- β -глюканазна активність та ендо-1,4- β -ксилазна активність походять щонайменше з двох різних ферментів, наприклад, щонайменше двох різних ферментів із двох різних видів.

У деяких варіантах здійснення загальне підвищення тиску є зменшеним до значення менше 470 мм WC, наприклад, менше 450 мм WC, наприклад, менше 430 мм WC, наприклад, менше 410 мм WC, наприклад, менше 390 мм WC, наприклад, менше 370 мм WC, наприклад, менше 350 мм WC, наприклад, менше 330 мм WC, наприклад, менше 310 мм WC, наприклад, менше 300 мм WC, наприклад, менше 290 мм WC, при застосуванні композиції згідно з даним винаходом перед фільтруванням пивного суслу у пивоварінні.

У деяких варіантах здійснення загальне підвищення тиску є зменшеним щонайменше на 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 або 95% у порівнянні із застосуванням негативного контролю без зазначеної композиції, причому при застосуванні перед фільтруванням пивного суслу у пивоварінні.

У деяких варіантах здійснення фільтрувальність суслу, виміряна за об'ємом суслу, зібраного через 5 хв. фільтрації, у порівнянні з контролем без ферментів є підвищеною до більше 1,5, наприклад, більше 1,6, наприклад, більше 1,7, наприклад, більше 1,8, наприклад, більше 1,9, наприклад, більше 2,0, наприклад, більше 2,1, наприклад, більше 2,2, наприклад, більше 2,3, наприклад, більше 2,4, наприклад, більше 2,5, при застосуванні композиції згідно з даним винаходом у пивоварінні перед відділенням суслу.

У деяких варіантах здійснення фільтрувальність суслу, виміряна за об'ємом суслу, зібраного

через 5 хв. фільтрації, є підвищеною щонайменше на 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 або 300% у порівнянні із застосуванням негативного контролю без зазначеної композиції.

У деяких варіантах здійснення композиція згідно з даним винаходом містить будь-який один або декілька додаткових ферментів. У деяких варіантах здійснення один або декілька додаткових ферментів вибрані з переліку, що складається з ксиланази, віднесеної до ЕС 3.2.1.32, ЕС 3.2.1.136 або ЕС 3.2.1.156, целюлази, ламінаринази, ендо-1,5- α -L-арабінази, бета-D-глюкозидглюкогідролази, β -ксилозидази, целобіогідролази, глюкан-1,4-бета-глюкозидази, ксилоглюкан-специфічної екзо-бета-1,4-глюканази та α -N-арабінофуранозидази.

Послідовності та ферменти, визначені за допомогою послідовності, згаданої у даному документі, і застосовувані згідно з даним винаходом окремо або у комбінаціях з іншими ферментами або сполуками, можуть бути з сигнальним пептидом або без сигнального пептиду.

15 Дослідження

Спосіб для целюлазної активності з використанням DNS (спосіб з використанням DNS та CMC)

Систематична назва: 1,4-(1,3;1,4)- β -D-глюкан-4-глюканогідролаза.

Номер IUB: ЕС 3.2.1.4.

20 Принцип

Дослідження целюлази базувалося на ферментативному ендогідролізі 1,4- β -D-глюкозидних зв'язків у карбоксиметилцелюлозі (CMC), β -1,4-глюкані. Продукти реакції (олігосахариди β -1,4-глюкану) визначали колориметрично за допомогою вимірювання одержаного в результаті збільшення кількості груп, що відновлюють, з використанням реактиву на основі 3,5-динітросаліцилової кислоти. Ферментну активність розраховували виходячи із залежності між концентрацією груп, що відновлюють, у якості еквівалентів глюкози і поглинанням при 540 нм.

Дослідження здійснювали при рН 5,0, але його можна проводити при різних значеннях рН для додаткової характеристики та опису ферментів.

30 Визначення одиниць

Одну одиницю целюлазної активності визначали як кількість ферменту, яка утворювала 1 мкмоль еквівалентів глюкози за хвилину за умов дослідження (рН 5,0 (або як вказано) та 50 °С).

Матеріали

Карбоксиметилцелюлоза. Постачальник: Megazyme Ltd. № продукту: CM-целюлоза 4M, D-глюкоза 'AnalaR'. Постачальник: Merck Ltd (BDH). № продукту: 10117. M.W.: 180,16.

35 Безводний ацетат натрію 'AnalaR'. Постачальник: Merck Ltd (BDH). № продукту: 10236. M.W.: 82,03.

Оцтова кислота ("льодяна") 'AnalaR'. Постачальник: Merck Ltd (BDH). № продукту: 10001. M.W.: 60,05.

3,5-динітросаліцилова кислота GPR (3,5-динітро-2-гідроксибензойна кислота). Постачальник: Merck Ltd (BDH). № продукту: 28235.

40 Гранули гідроксиду натрію 'AnalaR'. Постачальник: Merck Ltd (BDH). № продукту: 10252. M.W.: 40,00.

(+)-Тартрат калію-натрію 'AnalaR'. Постачальник: Merck Ltd (BDH). № продукту: 10219. M.W.: 282,22.

45 1,5% (ваг./об. розчину) розчин карбоксиметилцелюлози (CMC) в 0,1M натрій-ацетатному буфері, рН 5,0 (розчин субстрату).

Розчин 3,5-динітросаліцилової кислоти (DNS). 20 г/л DNS у буфері, що містить 32 г/л гранул гідроксиду натрію і 600 г/л (+)-тартрату калію-натрію.

Стандартний розчин глюкози (0,50 мг/мл).

50 Методика

Ферментну композицію розбавляли з одержанням зразків і калібрувальну криву для глюкози, як показано на Фіг. 2, будували з використанням концентрацій глюкози 0, 0,125, 0,25, 0,375 та 0,5 мг/мл.

55 0,25 мл ферментного розчину змішували з 1,75 мл розчину субстрату (1,5% ваг./об.) при 50 °С і реакцію зупиняли через 10 хв. за допомогою додавання розчину DNS. За цим слідувало нагрівання до 95 °С протягом 5 хвилин.

Оптичну густина вимірювали при 540 нм ($OD_{540\text{nm}}$) у різних зразках.

Розрахунок

Ферментну активність визначали виходячи з калібрувальної кривої, як показано на Фіг. 2.

60 Активність розраховували наступним чином.

$$\text{Активність (од.мл}^{-1} \text{ або од.г}^{-1}) = \frac{T - c}{m} \times A \times \frac{1}{180.16} \times 10^3 \times \frac{1}{v} \times \frac{1}{t} \times D,$$

де

5 $T = \Delta OD_{540\text{нм}}$ ДОСЛІДЖУВАНОВОГО ЗРАЗКА
 $= OD_{540\text{нм}}$ ДОСЛІДЖУВАНОВОГО ЗРАЗКА - $OD_{540\text{нм}}$ ХОЛОСТОЇ ПРОБИ;
 m = градієнт калібрувальної кривої (приблизно 1,0);
 c = відрізок, що відсікається калібрувальною кривою на осі y (завжди негативна величина і приблизно $-0,02$);

10 $180,16 \Xi$ молекулярна вага глюкози;

$10^3 \Xi$ для перерахунку у мкмолі;

$A \Xi$ об'єм дослідження у мл;

$V \Xi$ об'єм ферменту у мл;

$t \Xi$ час дослідження у хвилинах;

15 D = фактичний коефіцієнт розбавлення для ферменту (наприклад, для 1,000 г при розбавленні до 1 літра $D = 1000$).

Ламінариназа (спосіб з використанням DNS і ламінарину)

Принцип

20 Реакція, що каталізується ламінариною, передбачає ендогідроліз 1,3-глюкозидних зв'язків в 1,3- β -D-глюканах. Субстрати включали ламінарин, парамілон та пахіман. Продукти реакції (олігосахариди β -1,3-глюкану) визначали колориметрично за допомогою вимірювання одержаного у результаті збільшення кількості груп, що відновлюють, з використанням реактиву на основі 3,5-динітросаліцилової кислоти. Ферментну активність розраховували виходячи із залежності між концентрацією груп, що відновлюють, у якості еквівалентів глюкози та поглинанням при 540 нм.

Дослідження здійснювали при pH 5,0 і 50 °C, але його можна проводити при різних значеннях pH і температури для додаткової характеристики та опису ферментів.

Визначення одиниці

30 Одну одиницю ламінариназної активності визначали як кількість ферменту, яка утворювала 1 мкмоль еквівалентів глюкози за хвилину за умов дослідження (pH 5,0 та 50 °C (або як вказано)).

Матеріали

Див. матеріали, наведені вище, для дослідження целюлазної активності.

Ламінарин (із *Laminaria digitata*). Постачальник: Sigma-Aldrich Co. Ltd. № продукту: L 9634.

35 1,00% (ваг./об. розчину) розчин ламінарину (розчин субстрату в 0,1M натрій-ацетатному буфері, pH 5,0).

1,75 мл розчину ламінарину змішували з 0,25 мл розбавленого ферментного розчину при 50 °C протягом 10 хвилин і реакцію зупиняли додаванням 2 мл розчину DNS.

40 Калібрувальну криву будували з використанням розчинів глюкози з 0, 0,125, 0,25, 0,5 та 0,75 мг/мл.

Оптичну густину вимірювали при 540 нм ($OD_{540\text{нм}}$).

Розрахунок

Активність розраховували наступним чином.

45
$$\text{Активність (од.мл}^{-1} \text{ або од.г}^{-1}) = \frac{T - c}{m} \times A \times \frac{1}{180.16} \times 10^3 \times \frac{1}{v} \times \frac{1}{t} \times D,$$

де

$T = \Delta OD_{540\text{нм}}$ ДОСЛІДЖУВАНОВОГО ЗРАЗКА

50 $= OD_{540\text{нм}}$ ДОСЛІДЖУВАНОВОГО ЗРАЗКА - $OD_{540\text{нм}}$ ХОЛОСТОЇ ПРОБИ;

m = градієнт калібрувальної кривої (приблизно 1,0);

c = відрізок, що відсікається калібрувальною кривою на осі y (завжди негативна величина і приблизно $-0,03$);

$180,16 \Xi$ молекулярна вага глюкози;

$10^3 \Xi$ для перерахунку у мкмолі;

55 $A \Xi$ об'єм дослідження у мл;

$V \Xi$ об'єм ферменту у мл;

$t \Xi$ час дослідження у хвилинах;

D = коефіцієнт розбавлення для ферменту (наприклад, для 1 г при розбавленні до 1 літра D)

= 1000).

Дослідження арабінази

Принцип

5 Дослідження арабіназної активності базувалося на колориметричному визначенні за допомогою вимірювання одержаного у результаті збільшення кількості груп, що відновлюють, з використанням реактиву на основі 3,5-динітросаліцилової кислоти. Ферментну активність розраховували виходячи із залежності між концентрацією груп, що відновлюють, у якості еквівалентів арабінози і поглинанням при 540 нм.

10 Дослідження здійснювали при рН 3,5, але його можна проводити при різних значеннях рН для додаткової характеристики та опису ферментів.

Визначення одиниці

Одну одиницю арабіназної активності (арабіназаза (ендо-1,5-альфа-L-арабіназаза)) визначали як кількість ферменту, яку утворював 1 мкмоль еквівалентів арабінози за хвилину за умов дослідження (рН 3,5 (або як вказано) та 50 °С).

15 Матеріали

Арабінан з цукрового буряка від Megazyme.

Арабіноза від Sigma, A3131. M.W.: 150,1.

Безводний ацетат натрію 'AnalaR'. Постачальник: Merck Ltd (BDH). № продукту: 10236. M.W.: 82,03.

20 Оцтова кислота ("льодяна") 'AnalaR'. Постачальник: Merck Ltd (BDH). № продукту: 10001. M.W.: 60,05.

3,5-динітросаліцилова кислота GPR (3,5-динітро-2-гідроксибензойна кислота). Постачальник: Merck Ltd (BDH). № продукту: 28235.

25 Гранули гідроксиду натрію 'AnalaR'. Постачальник: Merck Ltd (BDH). № продукту: 10252. M.W.: 40,00.

(+)-Тартрат калію-натрію 'AnalaR'. Постачальник: Merck Ltd (BDH). № продукту: 10219. M.W.: 282,22.

1,5% (ваг./об. розчину) розчин арабінану в 0,1М натрій-ацетатному буфері, рН 3,5 (розчин субстрату).

30 Розчин 3,5-динітросаліцилової кислоти (DNS). 20 г/л DNS у буфері, що містить 32 г/л гранул гідроксиду натрію та 600 г/л (+)-тартрату калію-натрію.

Стандартний розчин арабінази (0,50 мг/мл).

Методика

35 Ферментну композицію розбавляли з одержанням зразків і калібрувальну криву для глюкози будували з використанням концентрацій арабінази 0, 0,125, 0,25, 0,375 та 0,5 мг/мл.

0,25 мл ферментного розчину змішували з 1,75 мл розчину субстрату (1,5% ваг./об.) при 50 °С і реакцію зупиняли через 10 хв. за допомогою додавання розчину DNS. За цим слідувало нагрівання до 95 °С протягом 5 хвилин.

Оптичну густину вимірювали при 540 нм ($OD_{540\text{нм}}$) у різних зразках.

40 Розрахунок

Ферментну активність визначали виходячи з калібрувальної кривої.

Активність розраховували наступним чином.

$$\text{Активність (одмл}^{-1} \text{ або одг}^{-1}) = \frac{T - c}{m} \times A \times \frac{1}{180.16} \times 10^3 \times \frac{1}{v} \times \frac{1}{t} \times D,$$

45

де

$T = \Delta OD_{540\text{нм}}$ ДОСЛІДЖУВАНОВОГО ЗРАЗКА

$= OD_{540\text{нм}}$ ДОСЛІДЖУВАНОВОГО ЗРАЗКА - $OD_{540\text{нм}}$ ХОЛОСТОЇ ПРОБИ;

m = градієнт калібрувальної кривої (приблизно 1,0);

50 c = відрізок, що відсікається калібрувальною кривою на осі у (завжди негативна величина і приблизно -0,02);

150,13 Ξ молекулярна вага арабінази;

$10^3 \Xi$ для перерахунку у мкмолі;

$A \Xi$ об'єм дослідження у мл;

55 $V \Xi$ об'єм ферменту у мл;

$t \Xi$ час дослідження у хвилинах;

D = фактичний коефіцієнт розбавлення для ферменту (наприклад, для 1,000 г при розбавленні до 1 літра $D = 1000$).

Дослідження арабінофуранозидази

Реакція, що каталізується α -N-арабінофуранозидазою, передбачає гідроліз кінцевого зв'язку по α -L-арабінофуранозидному залишку, що не відновлює, α -L-арабінозидів. Фермент діяв на α -L-арабінофуранозиди, α -L-арабініани, що містять (1,3)- та/або(1,5)-зв'язки, арабіноксилани та арабіногалактани.

5 Дослідження α -N-арабінофуранозидази базувалося на ферментативному гідролізі п-нітрофеніл- α -L-арабінофуранозиду. Дослідження здійснювали за допомогою способу з "двома моментами часу", а не "безперервного спостереження". Розрахунок ферментної активності базувався на вимірюваннях, проведених тільки на початку і наприкінці періоду інкубації. Продукт реакції, п-нітрофенол, визначали колориметрично (після доведення рН). Ферментну активність розраховували виходячи із залежності між концентрацією п-нітрофенолу і поглинанням при 400 нм.

Одержання розбавленого ферментного розчину

15 Одержували усі ферментні розчини з порошку або рідких ферментних препаратів за допомогою прозорої дистильованої води. Зводили до мінімуму помилки розбавлення в дослідженні шляхом усунення етапів з більшим розбавленням, які передбачали невеликі значення об'єму або ваги. При здійсненні розбавлень ферментів, навіть для рідкого зразка, зважування вихідного зразка ферменту було більш точним. Отже, якщо це виконано, у випадку рідких зразків необхідно виміряти відносну густину рідини при 20 °С.

20 Через те, що дослідження здійснювали за допомогою способу з "двома моментами часу", а не "безперервного спостереження", важливо було забезпечити виконання лінійного закону у межах періоду інкубації з різними ферментними системами і умовами. При стандартних умовах дослідження, концентрації субстрату, рН, температурі і часі дослідження, було показано, що при здійсненні дослідження виконувався лінійний закон у діапазоні ΔOD_{540nm} ДОСЛІДЖУВАНОВОГО ЗРАЗКА (Т) = 0,20-1,50. Однак, для належного практичного застосування дослідження виконували у межах певного діапазону ΔOD_{540nm} ДОСЛІДЖУВАНОВОГО ЗРАЗКА (Т) = 0,400-0,800.

Методика

30 Кожне дослідження зразка ферменту передбачало три аналізи: аналізи досліджуваного зразка у двох повторностях (ДОСЛІДЖУВАНІЙ ЗРАЗОК) і аналіз холостої проби (ХОЛОСТА ПРОБА). Наведена методика описувала аналіз одного зразка ферменту.

	ДОСЛІДЖУВАНІЙ ЗРАЗОК	ХОЛОСТА ПРОБА
0,2М буферний розчин ацетату натрію, рН 5,0	1,00 мл	1,00 мл
Прозора дистильована вода	1,00 мл	1,00 мл
Розчин п-нітрофеніл- α -L-арабінофуранозиду	1,00 мл	1,00 мл

0,25 мл розбавленого ферментного розчину додавали до розчинів при 50 °С, реакцію зупиняли через 10 хвилин додаванням 4 мл 0,4М розчину гліцину, рН 10,8 (стоп-реагент).

Поглинання вимірювали при 400 нм при 25 °С проти холостого розчину.

35 • Визначали OD_{400nm} ДОСЛІДЖУВАНОВОГО ЗРАЗКА для вимірюваних ДОСЛІДЖУВАНІХ ЗРАЗКІВ у двох повторностях.

• Визначали OD_{400nm} ХОЛОСТОЇ ПРОБИ.

Розрахунок

40 ΔOD_{400nm} ДОСЛІДЖУВАНОВОГО ЗРАЗКА (Т) = OD_{400nm} ДОСЛІДЖУВАНОВОГО ЗРАЗКА - OD_{400nm} ХОЛОСТОЇ ПРОБИ

$$\text{Одиниці (мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1}) = \frac{T}{18300} \times \frac{V}{1000} \times 10^6 \times \frac{1}{t},$$

$$\text{Активність (одмл}^{-1} \text{ або од} \cdot \text{r}^{-1}) = \text{Одиниці} \times \frac{1}{E} \times D,$$

де

T = OD_{400nm} ДОСЛІДЖУВАНОВОГО ЗРАЗКА - OD_{400nm} ХОЛОСТОЇ ПРОБИ;

18300 = молярний коефіцієнт екстинкції для п-нітрофенолу (довжина шляху 1 см);

V = 7,25 (загальний об'єм рідини у досліджуваному зразку в мл);

50 t = 10 (хвилини);

1 од. = 1 мкмоль.хв⁻¹;

E = 0,25 (об'єм розбавленого ферменту у мл);

D = коефіцієнт розбавлення для ферменту, наприклад, для 1 мл при розбавленні до 1 літра D = 1000).

Дослідження целобіогідролази

Принцип

5 Реакція, що каталізується целобіогідролазою, передбачає гідроліз 1,4-β-D-глюкозидних зв'язків у целюлозі і целотетраозі з вивільненням целобіози з кінців ланцюгів, що не відновлюють.

Дослідження целобіогідролази базувалося на ферментативному гідролізі п-нітрофеніл-β-D-целобіопіранозиду. Продукт реакції, п-нітрофенол, визначали колориметрично (після доведення рН). Ферментну активність розраховували виходячи із залежності між концентрацією п-нітрофенолу і поглинанням при 400 нм.

10 Дослідження виконували в межах визначеного лінійного діапазону ΔOD_{540nm} ДОСЛІДЖУВАНОВОГО ЗРАЗКА (T) = 0,400-0,800.

Методика

15 Кожне дослідження зразка ферменту передбачало три аналізи: аналізи досліджуваного зразка у двох повторностях (ДОСЛІДЖУВАНИЙ ЗРАЗОК) і аналіз холостої проби (ХОЛОСТА ПРОБА). Наведена методика описувала аналіз одного зразка ферменту.

	ДОСЛІДЖУВАНИЙ ЗРАЗОК	ХОЛОСТА ПРОБА
0,2М буферний розчин ацетату натрію, рН 5,0	1,00 мл	1,00 мл
Прозора дистильована вода	1,00 мл	1,00 мл
Розчин п-нітрофеніл-β-D-целобіопіранозиду	1,00 мл	1,00 мл

20 0,25 мл розбавленого ферментного розчину додавали до досліджуваного розчину при 50 °С, через 30 хвилин у кожен пробірник додавали 4 мл 0,4М розчину гліцину, рН 10,8 (стоп-реагент).

Поглинання вимірювали при 20 °С при 400 нм у 1 см скляній кюветі проти холостого розчину.

25 • Визначали OD_{400nm} ДОСЛІДЖУВАНОВОГО ЗРАЗКА для вимірюваних ДОСЛІДЖУВАНИХ ЗРАЗКІВ у двох повторностях.

• Визначали OD_{400nm} ХОЛОСТОЇ ПРОБИ.

Розрахунок

DO_{400nm} ДОСЛІДЖУВАНОВОГО ЗРАЗКА (T) = OD_{400nm} ДОСЛІДЖУВАНОВОГО ЗРАЗКА - OD_{400nm} ХОЛОСТОЇ ПРОБИ

30 $Одиниці(мкмоль \cdot хв^{-1}) = \frac{T}{18300} \times \frac{V}{1000} \times 10^6 \times \frac{1}{t},$

$Активність(одмл^{-1} \text{ або од.г}^{-1}) = Одиниці \times \frac{1}{E} \times D,$

35

де

T = OD_{400nm} ДОСЛІДЖУВАНОВОГО ЗРАЗКА - OD_{400nm} ХОЛОСТОЇ ПРОБИ;

18300 = молярний коефіцієнт екстинкції для п-нітрофенолу (довжина шляху 1 см);

V = 7,25 (загальний об'єм рідини у досліджуваному зразку в мл);

1000 = для перерахунку у літри;

40

10^6 = для перерахунку у мкмолі;

t = 30 (хвилини);

1 од. = 1 мкмоль.хв⁻¹;

E = 0,25 (об'єм розбавленого зразка ферменту у мл);

45 D = коефіцієнт розбавлення для ферменту, наприклад, для 1 мл при розбавленні до 1 літра D = 1000).

Пронумеровані варіанти здійснення згідно даного винаходу

1. Фермент, який характеризується енд-1,4-β-ксиланазною активністю, причому даний фермент містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 80% ідентичність із будь-якою послідовністю, вибраною з 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 і SEQ ID NO:18 або їх будь-якого функціонального фрагмента.

2. Фермент згідно з варіантом здійснення 1, причому даний фермент має співвідношення

активності щодо розчинного арабіноксиланового субстрату (WE-AX) і нерозчинного арабіноксиланового субстрату (WU-AX), які відносяться до арабіноксиланового субстрату, менше приблизно 7,0, наприклад, менше приблизно 6,5, наприклад, менше приблизно 6,0, наприклад, менше приблизно 5,5, наприклад, менше приблизно 5,0, наприклад, менше приблизно 4,5.

3. Фермент, який характеризується ендо-1,3(4)- β -глюканазною активністю, причому даний фермент містить амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 80% ідентичність з будь-якою послідовністю, вибраною з SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 і SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 або їх будь-якого функціонального фрагмента.

4. Фермент згідно з будь-яким із варіантів здійснення 1-3, причому даний фермент характеризується оптимальним значенням температури у діапазоні 40-70 °C, наприклад, у діапазоні 45-65 °C, наприклад, у діапазоні 50-65 °C, наприклад, у діапазоні 55-65 °C.

5. Фермент згідно з будь-яким із варіантів здійснення 1-4, де вказаний фермент має щонайменше 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99% ідентичність з будь-якою амінокислотною послідовністю, вибраною з SEQ ID NO: 1-18 або їх будь-якого функціонального фрагмента.

6. Фермент згідно з будь-яким із варіантів здійснення 1-5, який має загальну кількість амінокислот менше 350, наприклад, менше 340, наприклад, менше 330, наприклад, менше 320, наприклад, менше 310, наприклад, менше 300 амінокислот, наприклад, у діапазоні 200-350, наприклад, у діапазоні 220-345 амінокислот.

7. Фермент згідно з будь-яким із варіантів здійснення 1-6, де амінокислотна послідовність зазначеного ферменту має щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять або десять амінокислотних замінів у порівнянні з будь-якою амінокислотною послідовністю, вибраною з SEQ ID NO: 1-18 або їх будь-якого функціонального фрагмента.

8. Фермент згідно з будь-яким із варіантів здійснення 1-7, де амінокислотна послідовність зазначеного ферменту має максимум одну, дві, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять або десять амінокислотних замінів у порівнянні з будь-якою амінокислотною послідовністю, вибраною з SEQ ID NO: 1-18 або їх будь-якого функціонального фрагмента.

9. Фермент згідно з будь-яким із варіантів здійснення 1-8, причому даний фермент містить амінокислотну послідовність, визначену у будь-якій із SEQ ID NO: 1-18 або їх будь-якого функціонального фрагмента.

10. Фермент згідно з будь-яким із варіанту здійснення 1 або варіанту здійснення 3, причому даний фермент складається з амінокислотної послідовності, визначеної у будь-якій із SEQ ID NO: 1-18 або їх будь-якому функціональному фрагменті.

11. ДНК-конструкт, який містить послідовність ДНК, що кодує фермент згідно з будь-яким із варіантів здійснення 1-10.

12. Рекомбінантний вектор експресії, який містить ДНК-конструкт згідно з варіантом здійснення 11.

13. Клітина, яка була трансформована ДНК-конструктом згідно з варіантом здійснення 11 або вектором згідно з варіантом здійснення 12.

14. Препарат, який містить фермент згідно з будь-яким із варіантів здійснення 1-10, або ДНК-конструкт згідно з варіантом здійснення 11, або вектор згідно з варіантом здійснення 12, або клітину згідно з варіантом здійснення 13.

15. Композиція, яка містить фермент, що характеризується ендо-1,4- β -ксиланазною активністю, згідно з будь-яким із варіанту здійснення 1, варіанту здійснення 2, варіантів здійснення 4-10 у комбінації з будь-якою однією або декількома β -глюканазами.

16. Композиція згідно з варіантом здійснення 15, де зазначена одна або декілька β -глюканаз являють собою фермент, який характеризується ендо-1,3(4)- β -глюканазною активністю, за будь-яким із варіантів здійснення 3-10.

17. Композиція, яка містить фермент, що характеризується ендо-1,3(4)- β -глюканазною активністю, згідно з будь-яким із варіантів здійснення 3-10 у комбінації з будь-якою однією або декількома ксиланазами.

18. Композиція згідно з варіантом здійснення 17, де зазначена одна або декілька ксиланаз являють собою фермент, який характеризується ендо-1,4- β -ксиланазною активністю, згідно з будь-яким із варіанту здійснення 1, варіанту здійснення 2, варіантів здійснення 4-10.

19. Композиція згідно з будь-яким із варіантів здійснення 15-18, де зазначена ендо-1,3(4)- β -глюканазна активність і зазначена ендо-1,4- β -ксиланазна активність походять щонайменше з двох різних ферментів, наприклад, щонайменше двох різних ферментів із двох різних видів.

20. Композиція за будь-яким із пп. 15-19, яка містить комбінацію щонайменше двох

ферментів, причому вказані два ферменти або два ферменти з амінокислотною послідовністю, що має щонайменше 80% ідентичність послідовності з відповідною SEQ ID або її будь-яким функціональним фрагментом, вибрані з переліку, що складається з

- 5 SEQ ID NO:1 i SEQ ID NO:7;
SEQ ID NO:2 i SEQ ID NO:7;
SEQ ID NO:3 i SEQ ID NO:7;
SEQ ID NO:4 i SEQ ID NO:7;
SEQ ID NO:5 i SEQ ID NO:7;
SEQ ID NO:6 i SEQ ID NO:7;
- 10 SEQ ID NO:17 i SEQ ID NO:7;
SEQ ID NO:18 i SEQ ID NO:7;
SEQ ID NO:1 i SEQ ID NO:8;
SEQ ID NO:2 i SEQ ID NO:8;
SEQ ID NO:3 i SEQ ID NO:8;
- 15 SEQ ID NO:4 i SEQ ID NO:8;
SEQ ID NO:5 i SEQ ID NO:8;
SEQ ID NO:6 i SEQ ID NO:8;
SEQ ID NO:17 i SEQ ID NO:8;
SEQ ID NO:18 i SEQ ID NO:8;
- 20 SEQ ID NO:1 i SEQ ID NO:9;
SEQ ID NO:2 i SEQ ID NO:9;
SEQ ID NO:3 i SEQ ID NO:9;
SEQ ID NO:4 i SEQ ID NO:9;
SEQ ID NO:5 i SEQ ID NO:9;
- 25 SEQ ID NO:6 i SEQ ID NO:9;
SEQ ID NO:17 i SEQ ID NO:9;
SEQ ID NO:18 i SEQ ID NO:9;
SEQ ID NO:1 i SEQ ID NO:10;
SEQ ID NO:2 i SEQ ID NO:10;
- 30 SEQ ID NO:3 i SEQ ID NO:10;
SEQ ID NO:4 i SEQ ID NO:10;
SEQ ID NO:5 i SEQ ID NO:10;
SEQ ID NO:6 i SEQ ID NO:10;
SEQ ID NO:17 i SEQ ID NO:10;
- 35 SEQ ID NO:18 i SEQ ID NO:10;
SEQ ID NO:1 i SEQ ID NO:11;
SEQ ID NO:2 i SEQ ID NO:11;
SEQ ID NO:3 i SEQ ID NO:11;
- 40 SEQ ID NO:4 i SEQ ID NO:11;
SEQ ID NO:5 i SEQ ID NO:11;
SEQ ID NO:6 i SEQ ID NO:11;
SEQ ID NO:17 i SEQ ID NO:11;
SEQ ID NO:18 i SEQ ID NO:11;
- 45 SEQ ID NO:1 i SEQ ID NO:12;
SEQ ID NO:2 i SEQ ID NO:12;
SEQ ID NO:3 i SEQ ID NO:12;
SEQ ID NO:4 i SEQ ID NO:12;
SEQ ID NO:5 i SEQ ID NO:12;
- 50 SEQ ID NO:6 i SEQ ID NO:12;
SEQ ID NO:17 i SEQ ID NO:12;
SEQ ID NO:18 i SEQ ID NO:12;
SEQ ID NO:1 i SEQ ID NO:13;
SEQ ID NO:2 i SEQ ID NO:13;
- 55 SEQ ID NO:3 i SEQ ID NO:13;
SEQ ID NO:4 i SEQ ID NO:13;
SEQ ID NO:5 i SEQ ID NO:13;
SEQ ID NO:6 i SEQ ID NO:13;
SEQ ID NO:17 i SEQ ID NO:13;
- 60 SEQ ID NO:18 i SEQ ID NO:13;
SEQ ID NO:1 i SEQ ID NO:14;

SEQ ID NO:2 i SEQ ID NO:14;
 SEQ ID NO:3 i SEQ ID NO:14;
 SEQ ID NO:4 i SEQ ID NO:14;
 SEQ ID NO:5 i SEQ ID NO:14;
 5 SEQ ID NO:6 i SEQ ID NO:14;
 SEQ ID NO:17 i SEQ ID NO:14;
 SEQ ID NO:18 i SEQ ID NO:14;
 SEQ ID NO:1 i SEQ ID NO:15;
 SEQ ID NO:2 i SEQ ID NO:15;
 10 SEQ ID NO:3 i SEQ ID NO:15;
 SEQ ID NO:4 i SEQ ID NO:15;
 SEQ ID NO:5 i SEQ ID NO:15;
 SEQ ID NO:6 i SEQ ID NO:15;
 SEQ ID NO:17 i SEQ ID NO:15;
 15 SEQ ID NO:18 i SEQ ID NO:15;
 SEQ ID NO:1 i SEQ ID NO:16;
 SEQ ID NO:2 i SEQ ID NO:16;
 SEQ ID NO:3 i SEQ ID NO:16;
 SEQ ID NO:4 i SEQ ID NO:16;
 20 SEQ ID NO:5 i SEQ ID NO:16;
 SEQ ID NO:6 i SEQ ID NO:16;
 SEQ ID NO:17 i SEQ ID NO:16; i
 SEQ ID NO:18 i SEQ ID NO:16.

21. Композиція згідно з будь-яким із варіантів здійснення 15-20, де при застосуванні перед
 25 фільтруванням пивного сусла у пивоварінні загальне підвищення тиску є зменшеним до
 значення менше 470 мм WC, наприклад, менше 450 мм WC, наприклад, менше 430 мм WC,
 наприклад, менше 410 мм WC, наприклад, менше 390 мм WC, наприклад, менше 370 мм WC,
 наприклад, менше 350 мм WC, наприклад, менше 330 мм WC, наприклад, менше 310 мм WC,
 наприклад, менше 300 мм WC, наприклад, менше 290 мм WC.

22. Композиція згідно з будь-яким із варіантів здійснення 15-21, де при застосуванні перед
 фільтруванням пивного сусла у пивоварінні загальне підвищення тиску є зменшеним
 щонайменше на 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 або 95% у
 порівнянні із застосуванням негативного контролю без вказаної композиції.

23. Композиція згідно з будь-яким із варіантів здійснення 15-22, де при застосуванні у
 пивоварінні перед відділенням сусла фільтрувальність сусла, виміряна за об'ємом сусла,
 зібраного через 5 хв. фільтрації, у порівнянні з контролем без ферментів є підвищеною до
 більше 1,5, наприклад, більше 1,6, наприклад, більше 1,7, наприклад, більше 1,8, наприклад,
 більше 1,9, наприклад, більше 2,0, наприклад, більше 2,1, наприклад, більше 2,2, наприклад,
 40 більше 2,3, наприклад, більше 2,4, наприклад, більше 2,5.

24. Композиція згідно з будь-яким із варіантів здійснення 15-23, при застосуванні якої у
 пивоварінні перед відділенням сусла фільтрувальність сусла, виміряна за об'ємом сусла,
 зібраного через 5 хв. фільтрації, є підвищеною щонайменше на 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,
 45 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 або 300% у порівнянні із застосуванням негативного контролю
 без вказаної композиції.

25. Композиція згідно з будь-яким із варіантів здійснення 15-24, яка містить будь-який один
 або декілька додаткових ферментів.

26. Композиція згідно з варіантом здійснення 25, де вказаний один або декілька додаткових
 ферментів вибрані з переліку, що складається з ксиланази, віднесеної до ЕС 3.2.1.32, ЕС
 3.2.1.136 або ЕС 3.2.1.156, целюлази, ламінаринази, ендо-1,5- α -L-арабінази, бета-D-
 глюкозидглюкогідролази, β -ксилозидази, целобіогідролази, глюкан-1,4-бета-глюкозидази,
 ксилоглюкан-специфічної екзо-бета-1,4-глюканази та α -N-арабінофуранозидози.

27. Застосування ферменту згідно з варіантами здійснення 1-10, або препарату згідно з
 варіантом здійснення 14, або композиції згідно з будь-яким із варіантів здійснення 15-26 при
 одержанні харчового продукту, кормового продукту або солодового продукту-напою.

28. Застосування ферменту згідно з варіантами здійснення 1-10, або препарату згідно з
 варіантом здійснення 14, або композиції згідно з будь-яким із варіантів здійснення 15-26 при
 60 одержанні заготовок із тіста або випечених продуктів.

29. Застосування ферменту згідно з варіантами здійснення 1-10, або препарату згідно з варіантом здійснення 14, або композиції згідно з будь-яким із варіантів здійснення 15-26 при одержанні пульпи або паперу.

5 30. Застосування ферменту згідно з варіантами здійснення 1-10, або препарату згідно з варіантом здійснення 14, або композиції згідно з будь-яким із варіантів здійснення 15-26 для одержання злакових компонентів.

31. Застосування згідно з варіантом здійснення 29, при якому злак являє собою жито, пшеницю або ячмінь.

10 32. Застосування ферменту згідно з варіантами здійснення 1-10, або препарату згідно з варіантом здійснення 14, або композиції згідно з будь-яким із варіантів здійснення 15-26 при одержанні пива або модифікації побічних продуктів із процесу пивоваріння.

33. Застосування ферменту згідно з варіантами здійснення 1-10, або препарату згідно з варіантом здійснення 14, або композиції згідно з будь-яким із варіантів здійснення 15-26 при одержанні вина або соку.

15 34. Застосування ферменту згідно з варіантами здійснення 1-10, або препарату згідно з варіантом здійснення 14, або композиції згідно з будь-яким із варіантів здійснення 15-26 при одержанні біопалива першого або другого покоління, наприклад, біоетанолу.

20 35. Спосіб зміни фільтрувальності крохмаломісткого матеріалу, причому вказаний спосіб включає етап обробки зазначеного крохмаломісткого матеріалу ферментом згідно з варіантами здійснення 1-10, або препаратом згідно з варіантом здійснення 14, або композицією згідно з будь-яким із варіантів здійснення 15-26.

25 36. Спосіб зменшення підвищення тиску під час фільтрування пивного суслу у пивоварінні, причому вказаний спосіб включає етап обробки пивного затору ферментом згідно з варіантами здійснення 1-10, або препаратом згідно з варіантом здійснення 14, або композицією згідно з будь-яким із варіантів здійснення 15-26.

30 37. Спосіб одержання харчового продукту, кормового продукту або продукту-напою, наприклад, спиртного або безалкогольного напою, наприклад, напою на основі злаку або на основі солоду, наприклад, пива або віскі, причому вказаний спосіб включає етап обробки крохмаломісткого матеріалу ферментом згідно з варіантами здійснення 1-10, або препаратом згідно з варіантом здійснення 14, або композицією згідно з будь-яким із варіантів здійснення 15-26.

35 38. Спосіб одержання пивного затору, причому вказаний спосіб включає етап обробки крохмаломісткого матеріалу ферментом згідно з варіантами здійснення 1-10, або препаратом згідно з варіантом здійснення 14, або композицією згідно з будь-яким із варіантів здійснення 15-26.

39. Спосіб одержання біопалива першого або другого покоління, наприклад, біоетанолу, причому вказаний спосіб включає етап обробки крохмаломісткого матеріалу ферментом згідно з варіантами здійснення 1-10, або препаратом згідно з варіантом здійснення 14, або композицією згідно з будь-яким із варіантів здійснення 15-26.

40 40. Продукт, одержаний за допомогою способу згідно з будь-яким із варіантів здійснення 38-39.

41. Композиція, яка містить продукт згідно з варіантом здійснення 40, наприклад, в якій даний продукт присутній у діапазоні 0,1%-99,9%.

ПРИКЛАДИ

45 Приклад 1

Способи і результати стосовно до реєстрації ксиланаз/глюкенази для пивоваріння.

Описані нижче способи застосовували для скринінгу щодо ксиланаз і глюкеназ із застосуванням у пивоварінні.

Способи

50 Спосіб для ксиланазі з використанням арабіноксилану, що екстрагується водою (WE-AX)

Отримували зразки, з одержанням у даному дослідженні OD540 = приблизно 0,25-0,30, і стандарти ксилози (0, 0,125, 0,250, 0,375 і 0,500 мг/мл дистильованої води) у дистильованій воді. У момент часу $t=0$ хвилин 1,75 мл розчинного арабіноксилану із пшениці (0,5% арабіноксилан із пшениці (PWAXYH, Megazyme, Брей, Ірландія)) в 0,1M ацетаті натрію/оцтовій кислоті, pH 5) поміщали у пробірку при 50 °C. У момент часу $t=5$ хвилин 250 мкл ферментного розчину додавали до субстрату при 50 °C з наступним перемішуванням. Дистильовану воду використовували в якості холостої проби. У момент часу $t=15$ хвилин 2 мл розчину DNS (1% 3,5-динітросаліцилова кислота (DNS), 1,6% гідроксид натрію, 30% тартрат калію-натрію у дистильованій воді) додавали до ферментно-субстратного розчину і 2,0 мл стандартного розчину. Зразки, холості проби і стандарти з доданою DNS поміщали у киплячу водяну баню

(95 °C) на 5 хвилин. Слідом за цим зразки, холості проби і стандарти охолоджували шляхом їх поміщення у водяну баню при 25 °C на 20 хвилин. Оптичну густину всіх зразків зчитували при OD540 із застосуванням спектрофотометра. Виходячи з розбавлення зразків, кількості використуваного зразка і стандартів можна розрахувати активність ксиланаз у зразку.

5 Одну одиницю ендо-1,4-бета-ксиланазної активності щодо WE-AX визначали як кількість ферменту, яка утворювала 1 мкмоль еквівалентів ксилози за хвилину за умов, згаданих вище (спосіб для ксиланаз з використанням арабіноксилану, що екстрагується водою (WE-AX)).

Спосіб для ксиланаз з використанням арабіноксилану, що не екстрагується водою (WU-AX)

10 Зразки одержували в дистильованій воді. У момент часу $t=0$ хвилин 1,75 мл нерозчинної пшениці (0,5% арабіноксилан із пшениці (PWAXYI, Megazyme, Брей, Ірландія)) в 0,1M ацетаті натрію/оцтової кислоті, рН 5) поміщали у пробірку при 50 °C. У момент часу $t=5$ хвилин 250 мкл ферментного розчину додавали до субстрату при 50 °C з наступним перемішуванням. Дистильовану воду використувували в якості холостої проби. У момент часу $t=15$ хвилин зразки і холості проби поміщали у киплячу водяну баню (95 °C) на 5 хвилин. Слідом за цим зразки і

15 холості проби центрифугували для осадження залишкового нерозчинного субстрату. Кількість арабіноксилану, введеного в розчин, визначали із застосуванням способу, описаного Rouau, X. and Surget, A. (1994), Carbohydrate Polymers, 24, 123-132.

Ендо-1,4-бета-ксиланазну активність щодо WU-AX визначали як кількість розчинених пентоз (мкг пентоз) за умов, описаних вище, що давало визначення одиниці як мкг пентози/грам зразка ксиланаз.

20

Дослідження ксиланазної активності

Отримували зразки, з одержанням у даному дослідженні OD540 = приблизно 0,25-0,30, і стандарти ксилози (0, 0,125, 0,250, 0,375 і 0,500 мг/мл дистильованої води) у дистильованій воді. У момент часу $t=0$ хвилин 1,75 мл розчинного арабіноксилану із пшениці (0,5% арабіноксилан із пшениці (PWAXYH, Megazyme, Брей, Ірландія)) в 0,1M ацетаті натрію/оцтової кислоті, рН 5) поміщали у пробірку при 50 °C. У момент часу $t=5$ хвилин 250 мкл ферментного розчину додавали до субстрату при 50 °C з наступним перемішуванням. Дистильовану воду використувували в якості холостої проби. У момент часу $t=15$ хвилин 2 мл розчину DNS (1% 3,5-

25 арабіноксилан із пшениці (PWAXYH, Megazyme, Брей, Ірландія)) в 0,1M ацетаті натрію/оцтової кислоті, рН 5) поміщали у пробірку при 50 °C. У момент часу $t=5$ хвилин 250 мкл ферментного розчину додавали до субстрату при 50 °C з наступним перемішуванням. Дистильовану воду використувували в якості холостої проби. У момент часу $t=15$ хвилин 2 мл розчину DNS (1% 3,5-

30 динітросаліцилова кислота (DNS), 1,6% гідроксид натрію, 30% тартрат калію-натрію у дистильованій воді) додавали до ферментно-субстратного розчину і 2,0 мл стандартного розчину. Зразки, холості проби і стандарти з доданою DNS поміщали у киплячу водяну баню (95 °C) на 5 хвилин. Слідом за цим зразки, холості проби і стандарти охолоджували шляхом їх поміщення у водяну баню при 25 °C на 20 хвилин. Оптичну густину всіх зразків зчитували при OD540 із застосуванням спектрофотометра. Виходячи з розбавлення зразків, кількості використуваного зразка і стандартів можна розрахувати активність ксиланаз у зразку.

35

Одну одиницю ендо-1,4-бета-ксиланазної активності щодо WE-AX визначали як кількість ферменту, яка утворювала 1 мкмоль еквівалентів ксилози за хвилину за умов, згаданих вище.

Дослідження глюканазної активності

Отримували зразки, з одержанням у даному дослідженні OD540 у межах калібрувальної

40 кривої, і стандарти глюкози (0; 0,125; 0,250; 0,500 і 0,750 мг/мл дистильованої води) у дистильованій воді. У момент часу $t=0$ хвилин 1,75 мл бета-глюкану з ячменю (1,5% бета-глюкан з ячменю (P-BGBM, Megazyme, Брей, Ірландія)) в 1M ацетаті натрію/оцтової кислоті, рН 5) поміщали у пробірку при 50 °C. У момент часу $t=5$ хвилин 250 мкл ферментного розчину додавали до субстрату при 50 °C з наступним перемішуванням. Дистильовану воду використувували в якості холостої проби. У момент часу $t=15$ хвилин 2 мл розчину DNS (1% 3,

45 5-динітросаліцилова кислота (DNS), 1,6% гідроксид натрію, 30% тартрат калію-натрію у дистильованій воді) додавали до ферментно-субстратного розчину і 2,0 мл стандартного розчину. Зразки, холості проби і стандарти з доданою DNS поміщали у киплячу водяну баню (95 °C) на 15 хвилин. Слідом за цим зразки, холості проби і стандарти охолоджували шляхом їх поміщення на водяну баню при 25 °C протягом 20 хвилин. Оптичну густину всіх зразків зчитували при OD540 із застосуванням спектрофотометра. Виходячи з розбавлення зразків, кількості використуваного зразка і стандартів можна розрахувати глюканазну активність у зразку.

50

Одну одиницю ендо-1,3(4)-β-глюканазної активності визначали як кількість ферменту, яка утворювала 1 мкмоль еквівалентів глюкози за хвилину за умов дослідження (рН 5,0 (або як зазначено) і 50 °C).

55

Спосіб пивоваріння у лабораторному масштабі

Вивчення пивоваріння у лабораторному масштабі здійснювали з використанням солоду Pilsner:ячменю у співвідношенні 75:25 при співвідношенні вода:крупка 3:1 (150 мл:50 г крупки).

60 Спочатку воду попередньо нагрівали до 53 °C перед початком затирання і доведення рН (5,4, 2

M H₂SO₄). Після повернення до початкової температури (період 10 хв.) починали профіль затирання (див. Фіг. 1) і додавали ферменти. Після завершення затирання здійснювали відділення сусла з використанням звичайної пластмасової лійки і фільтрувального паперу (паперовий фільтр № 1, діаметр 24 см, Whatman, Англія). Ефективність фільтрації оцінювали так само, як і декілька інших параметрів сусла, таких як, наприклад, в'язкість, β-глюкан і пентозан.

Фільтрацію сусла вимірювали протягом 30 хв., після чого фільтрацію припиняли. Зібране сусло охолоджували перед будь-яким додатковим аналізом.

Фільтрація

Дані фільтрації представляли як об'єм сусла, зібраного через 5, 10, 15 і 30 хвилин у порівнянні з холостою пробою (пивоваріння без доданих екзогенних ферментів).

Пивоваріння у напівпромисловому масштабі

Випробування здійснювали на устаткуванні для пивоваріння у напівпромисловому масштабі (продуктивність 2 гектолітра). Відділення сусла здійснювали шляхом фільтрування пивного сусла і фільтрації пива за допомогою фільтрації через горизонтальний кізельгуровий фільтр.

Для виявлення оптимізації фільтрації за допомогою комбінації глюканази і ксиланази за "складних" умов пивоваріння здійснювали випробування пивоваріння у напівпромисловому масштабі з використанням змішаної крупки, що містить 75% солоду і 25% ячменю. Спочатку, встановлювали співвідношення вода:крупка при 2,8:1 (початок затирання), причому зі збільшенням до 3,1:1 на початку фільтрування пивного сусла. Для порівняння, співвідношення вода:крупка приблизно 3,2-3,8 є звичайними при фільтруванні пивного сусла у промисловій пивоварні. Таким чином, вважалось, що установні параметри даного напівпромислового випробування, співвідношення вода:крупка 3,1:1, перебували наприкінці шкали, що відповідає складним умовам.

Здійснювали сухе розмелювання солоду і ячменю із застосуванням двовальцевого млина. Розмелювання як ячменю, так і солоду здійснювали двічі з використанням відстані між вальцями ~0,7 мм.

Початок затирання здійснювали, прагнучи до початкової температури затору 53 °С. Після початку затирання здійснювали невеликі коректування, такі як регулювання об'єму затору для одержання співвідношення вода:крупка 2,8:1 і доведення рН до ~5,56 (молочна кислота). Після точного регулювання щодо затору додавали фермент і дотримувались профілю затирання, наведеного на фігурі 1. Витримку для оцукрення при 70 °С запрограмували на 15 хв., однак, період витримки подовжували на 5 хв. доти, поки йодна проба не показала, що крохмаль не був присутнім. (Ludwig Narziss and Werner Back, Technische Universitaet Muenchen (Fakultaet fuer Brauwesen, Weihenstephan), Abriss der Bierbrauerei. WILEY-VCH Verlags GmbH Weinheim Germany, 2005).

Завершення затирання починали після 5 хв. витримки при 78 °С. Затвор переміщували у фільтраційний чан, який заздалегідь наповнювали водою до рівня трохи нижче "удаваного дна". Затвор залишали для витримки протягом 5 хв. для осадження фільтраційного осаду. За цим слідувала рециркуляція протягом 15 хв. (140 л/година), що забезпечує осадження фільтраційного осаду та освітлення сусла. Типово, у промисловому пивоварінні фільтрацію будуть починати, коли отримано заданий ступінь помутніння сусла, однак, у даному випробуванні рециркуляцію залишали постійною на 15 хв., що давало можливість порівняння випробувань. Під час фільтрування пивного сусла збирали наступні дані, у тому числі час (хв.), об'єм зібраного сусла (л), різниця тиску при фільтрації по всьому фільтраційному осаду (мм WC, мм водяного стовпа), продуктивність насоса (%), ступінь помутніння сусла (EBC) і температура затору (°С).

Вважалось, що підвищення тиску по усьому фільтраційному осаду під час фільтрації було чинником, що справляв вплив на встановлення стандарту ефективності фільтрування пивного сусла. Досягнення дуже високих різниць тиску, наприклад, 250 мм WC під час першого збору сусла і, наприклад, 450 мм WC для решти періоду фільтрування пивного сусла, викликало розпушування фільтраційного осаду (також відоме як глибоке різання). Розпушування було процесом, при якому здійснювали руйнування фільтраційного осаду або полегшували утворення фільтраційного каналу шляхом уповільнення розрізання фільтраційного осаду за допомогою спеціально пристосованих ножів. Після розпушування фільтраційного осаду рециркуляцію сусла протягом 6 хв. (швидкість потоку 120 л/година) проводили з підготовкою фільтраційного осаду для подальшої фільтрації. Розпушування фільтраційного осаду сприяло ефективності фільтрації, яка була знижена в інших випадках, що в інших випадках також приводило у результаті до поганої якості сусла. Якщо викликане тиском розпушування не здійснювали до початку 3-го промивання дробини, автоматичні розпушування здійснювали на

початку 3-го і 4-го промивань дробини для забезпечення того, щоб повне блокування фільтрації не виникало безпосередньо перед завершенням відділення сусла.

Фільтрування пивного сусла здійснювали при установних параметрах, проілюстрованих у таблиці 1.

5

Таблиця 1

Установні параметри фільтрування пивного сусла.
Зібрані об'єми (л), фільтраційний потік (л/година) і об'єми для промивання дробини (л)

Сусло	Зібрані об'єми, л	Фільтраційний потік, л/год.	Об'єм для промивання дробини
Перше сусло	0-60	130	
1-е промивання	60-78	140	18
2-е промивання	78-96	160	18
3-е промивання	96-114	180	18
4-е промивання	114-140	180	26

Після закінчення фільтрування пивного сусла солодке сусло повертали у заторний чан, нагрівали до кипіння і додавали шишки хмелю. Охмеління продовжували протягом 80 хв. і наприкінці охмеління рН доводили до $5,10 \pm 0,05$. Шишки хмелю очищували від гіркого сусла за допомогою гідроциклонного чана і надалі сусло охолоджували до $\sim 8^\circ\text{C}$. Для зброджування вибирали висушені дріжджі низового бродіння (*Saccharomyces cerevisiae*) W34/70 від Fermentis. Дріжджі регідрували протягом 30 хв. і вводили при 100 г/л. Основне зброджування проводили протягом 5-6 днів при 10°C з наступним дозріванням при 15°C до виснаження і вмісту діацетилу нижче 80 частин на мільярд. Пиво зберігали протягом ще 2-3 тижнів при 1°C і 0,7 бар перед фільтрацією.

Здійснювали горизонтальну фільтрацію пива за допомогою 1,2 мкм свічкових картриджів PP і кізельгуру. До 8 картриджів могли бути включені у фільтрувальний елемент, що давало у результаті загальну площу фільтрації $\sim 0,5\text{ м}^2$. У даному дослідженні включали 3 картриджа і здійснювали фільтрацію при швидкості потоку 130 л/година, що давало у результаті швидкість фільтрації 6,9 гл/(година·м²). У промислових пивоварнях швидкість фільтрації зазвичай встановлюють у межах 5-7 гл (година·м²). Отже, очевидно, що дані установні параметри перебувають у границях верхньої межі, що відповідає навмисному вибору складних умов фільтрації пива для підтвердження можливих позитивних ефектів у результаті вибору використання ферменту у процесі пивоваріння. Під час фільтрації пива відслідковували швидкості потоку (л/година), а також значення тиску (P усередині і P за межами) для підтвердження ефективності фільтрації пива. Також ряд аналізів пива, наприклад, початкова густина (OG), видимий вміст екстрактивних речовин (AE), об'ємний вміст спирту (ABV), видимий ступінь зброджування (ADF), дійсний ступінь зброджування (RDF), рН, колір і гіркота, здійснювали для оцінки якості пива.

Результати
Ксиланази

Здійснювали скринінг ксиланаз на предмет їх активності щодо розчинного субстрату і нерозчинного субстрату, їх характеристик, пов'язаних з рН і температурою.

Результати показані у таблиці 2.

35

Таблиця 2

Ксиланази, скринінг яких проводили, їх активність щодо розчинного (WE-AX) і нерозчинного (WU-AX) арабіноксиланового субстрату та їх біохімічні характеристики відносно температури і рН

Назва	Походження	GH	WE-AX	WU-AX	WE-AX/WU-AX	Оптимальна темп., °C	T _{1/2} темп., °C	pH опт.
AfuXyn2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	11	7798	68790 526	8822	65	59	5,5

Таблиця 2

Ксиланази, скринінг яких проводили, їх активність щодо розчинного (WE-AX) і нерозчинного (WU-AX) арабіноксиланового субстрату та їх біохімічні характеристики відносно температури і рН

Назва	Походження	GH	WE-AX	WU-AX	WE-AX/WU-AX	Оптимальна темп., °C	T1/2 темп., °C	pH опт.
AfuXyn3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	11	26283	99716 865	3794	60	62	5
AfuXyn5	<i>Aspergillus fumigatus</i>	11	90005	71436 3158	7937	60	50	4
BsuXyn3	<i>Bacillus subtilis</i> BS3	11	82	10953 57	13388	50	n.d.	6
BsuXyn4	<i>Bacillus subtilis</i> BS4 #160	11	54	10054 00	18619	50	n.d.	6
TerXyn1	<i>Geosmithia emersonii</i>	10	1467	62087 86	4232	78	>78	3
AtuXyn3	<i>Aspergillus tubingensis</i>	10	1220	77609 82	6361	65	67	4,5
AtuXyn4	<i>Aspergillus tubingensis</i>	11	1600	12934 971	8084	45	58	5
AacXyn2	<i>Aspergillus aculeatus</i>	10	777	38804 91	4994	70	73	4
TreXyn2	<i>Trichoderma reesei</i>	11	2244	16015 846	7137	55	n.d.	5
TreXyn3	<i>Trichoderma reesei</i>	10	21487	14110 8772	6567	60	64	5,5
TreXyn5	<i>Trichoderma reesei</i>	11	1410	88428 16	6272	70	68	5
n.d. = не визначено								

Ферментні активності щодо WE-AX і WU-AX (од.) вимірювали, як описано у розділах “спосіб для ксиланази з використанням арабіноксилану, що екстрагується водою (WE-AX)” і “спосіб для ксиланази з використанням арабіноксилану, що не екстрагується водою (WU-AX)”.

- 5 Виходячи з результатів біохімічного скринінгу, ксиланази, що мають відповідне співвідношення активності щодо розчинного у порівнянні з нерозчинним арабіноксиланом, вибирали для додаткового тестування у випробуваннях, пов'язаних із застосуванням. Результати показані у таблиці 3.

Таблиця 3

Ксиланази, скринінг яких проводили, і відносний вихід екстракту, одержаний із застосуванням ксиланаз у порівнянні з холостою пробою (без ксиланаз). В остаточному підсумку, субстратну специфічність ксиланаз було проілюстровано як співвідношення їх активності відносно нерозчинного у порівнянні з розчинним арабіноксиланом (WU-AX/WE-AX)

Ефективність фільтрації						
Назва	Походження	5 хв.	10 хв.	15 хв.	30 хв.	WU-AX/WE-AX
Холоста проба		1,00	1,00	1,00	1,00	
BsuXyn3	Bacillus subtilis BS3	0,93	0,95	0,96	0,95	13388
BsuXyn4	Bacillus subtilis BS4 #160	n.d	n.d	n.d	n.d	18619
TerXyn1	Geosmithia emersonii (Talaromyces emersonii)	2,19	1,92	1,70	1,44	4232
AtuXyn3	Aspergillus tubingensis	2,06	1,75	1,59	1,37	6361
AtuXyn4	Aspergillus tubingensis	1,02	1,01	1,01	1,01	8084
AacXyn2	Aspergillus tubingensis	2,07	1,86	1,67	1,43	4994
TreXyn3	Trichoderma reesei	2,41	2,02	1,81	1,55	6567
TreXyn5	Trichoderma reesei	2,06	1,75	1,59	1,37	6272

Ефективність фільтрації вимірювали, як описано раніше ("фільтрація"), і вона була представлена як об'єм фільтрату в різні моменти часу у порівнянні з негативним контролем (холоста проба).

Ферментні активності щодо WE-AX і WU-AX (од.) вимірювали, як описано у розділах "спосіб для ксиланази з використанням арабіноксилану, що екстрагується водою (WE-AX)" і "спосіб для ксиланази з використанням арабіноксилану, що не екстрагується водою (WU-AX)".

Глюканази

Здійснювали скринінг глюканаз на предмет їх активності і характеристик, пов'язаних з температурою, і результати показані у таблиці 4.

Таблиця 4

Глюканази, скринінг яких проводили, їх активність та їх біохімічні характеристики відносно температури

Назва	Походження	Од./мл	Оптимальна темп., °C	T1/2 темп. буфера, °C	T1/2 темп. суслу, °C	pH опт.
TerGlu1	Talaromyces emersonii/Geosmithia emersonii	7338	70	78	78	3
BsuGluS	Bacillus subtilis	208	55-65	60	68	5-6
BsuGlu103FULL	Bacillus subtilis	391	50-60	53	58	5-6
TerGlu2	Trichoderma reesei	13	40-50	70	74	4,5-6

TerGlu3	Trichoderma reesei	9215	40-51	58	62	4,5-6
TerGlu4	Trichoderma reesei	n.d.	40-52	62	62	4,5-6
TerGlu6	Trichoderma reesei	n.d.	40-53	62	64	4,5-6
TerGlu7	Trichoderma reesei	n.d.	40-54	62	62	4,5-6
TerGlu8	Trichoderma reesei	n.d.	40-55	61	63	4,5-6
BsuGluC CBD	Bacillus subtilis	10	50-60	60	67	5-6
n.d. = не визначено						

Глюканазну активність/одиниці визначали, як описано у дослідженні глюканазної активності, описаному вище.

- 5 Виходячи з результатів біохімічного скринінгу, глюканаз, що мають придатні характеристики, вибирали для додаткового тестування в дослідженнях, пов'язаних із застосуванням. Результати показані у таблиці 5.

Таблиця 5

Назва і походження глюканаз, скринінг яких проводили, і відносний вихід екстракту, одержаний із застосуванням глюканаз у порівнянні з холостою пробою (без ферменту)

Назва	Походження	Ефективність фільтрації			
		5 хв.	10 хв.	15 хв.	30 хв.
Холоста проба	Негативний контроль	1,00	1,00	1,00	1,00
TerGlu1	Geosmithia emersonii	1,36	1,43	1,46	1,36
BsuGluS	Bacillus subtilis	1,48	1,49	1,48	1,35
BsuGlu103FULL	Bacillus subtilis	1,29	1,28	1,30	1,22
TerGlu2	Trichoderma reesei	1,15	1,18	1,20	1,15
TerGlu3	Trichoderma reesei	1,29	1,32	1,30	1,22
TerGlu4	Trichoderma reesei	1,11	1,11	1,11	1,09
TerGlu6	Trichoderma reesei	1,13	1,15	1,13	1,10
TerGlu7	Trichoderma reesei	1,06	n.d.	1,01	1,02
TerGlu8	Trichoderma reesei	1,12	1,11	1,13	1,09
BsuGluC CBD	Bacillus subtilis	1,33	1,37	1,37	1,32

- 10 Ефективність фільтрації вимірювали, як описано раніше ("фільтрація"), і вона була представлена як об'єм фільтрату у різні моменти часу у порівнянні з негативним контролем (холоста проба).

Виходячи з окремого скринінгу ксиланаз і глюканаз, здійснювали експерименти, які базувалися на комбінуванні, і результати були проілюстровані у таблиці 6.

Таблиця 6

Результати пивоваріння виходячи з експериментів, які базувалися на комбінуванні ксиланаз і глюканаз, у порівнянні з холостою пробою і у порівнянні з Ultraflo® Max. 250 одиниць грибною ксиланазою FXU-S/g; 700 одиниць целюлази EGU/g (Novozymes, Данія), причому результати були проілюстровані як одержаний відносний вихід екстракту

Назва	Походження	Ефективність фільтрації			
		5 хв.	10 хв.	15 хв.	30 хв.
Контроль		1,00	1,00	1,00	1,00
UFmax 0.1	A. aculeatus	2,29	2,13	2,00	1,77
BsuGluS/TauXyn1	B. sub/T. aurantiacus	1,70	1,69	1,60	1,47
BsuGluS/AtuXyn3	B. sub/A. tubingensis	2,57	2,14	1,96	1,75

(Походження UltraFlo® Max може передбачати інші мікроорганізми, крім A. aculeatus, наприклад, описані у патентному документі WO05059084).

Ефективність фільтрації вимірювали, як описано раніше ("фільтрація"), і вона була представлена як об'єм фільтрату у різні моменти часу у порівнянні з негативним контролем (холоста проба).

Придатні комбінації додатково тестували на 2 гл напівпромислового устаткування для підтвердження, і результати показані у таблиці 7 і на фігурі 3.

Таблиця 7

Результати пивоваріння у напівпромислому масштабі виходячи з підтвердження скринінгу глюканаз і ксиланаз. Глюканазу S B. sub у комбінації з ксиланазою A. tub тестували у порівнянні з холостою пробою і UltraFlo® Max. Зібрані дані являли собою середній потік (л/година), загальне підвищення тиску протягом фільтрування пивного сусла (мм WC) і зафіксований максимальний тиск під час фільтрування пивного сусла (мм WC)

ID зразка	Середній потік (л/год.)	Загальне підвищення тиску (мм WC)	Макс. тиск (мм WC)
Холоста проба	148	556	356
UltraFlo® Max	149	478	280
BsuGluS/AtuXyn3	147	263	163

Приклад 2

У даному прикладі було зроблено спробу показати, що ксиланаз для пивоваріння можуть характеризуватися дуже високою вибірковістю щодо високомолекулярного розчинного арабіноксилану (HMWS-AX) і арабіноксилану, що екстрагується водою (WE-AX). Таким чином, вважалось, що тільки обмежені кількості арабіноксилану повинні бути розчиненими. Отже, пов'язана із цим можливість стороннього присмаку була суттєво знижена.

Значно знижена в'язкість сприяла розділенню затору і відділенню пива. Необхідні характеристики ксиланаз для пивоваріння могли включати один або декілька з наступних аспектів у таблиці 8.

Таблиця 8

Критерії скринінгу для відбору ксиланаз

Субстратна специфічність ферменту
Співвідношення WE-AX/WU-AX чинить вплив на в'язкість
Вибірковість ферменту щодо субстрату

Те, наскільки близько до точок розгалуження фермент буде здійснювати розрізання, чинить вплив на функціональні властивості.
Термостабільність ферменту При тривалому розчиненні АХ під час затирання термостабільність є ключовою властивістю
Оптимальне значення рН для ферменту (рН 5,4-5,6)
Інгібування ферменту (наприклад, відомий ключовий фактор для ксиланаз)

Таблиця 9

Ксиланози – біохімічні характеристики
Інгібування ендогенними інгібіторами ксиланаз злаків відбувається щодо обох GH ксиланаз

GH ксиланаз	GH10	GH11
Mw	+ 30 кДа	20 кДа
Субстратна специфічність	Гідроліз близько до заміщень в арабінозі	Необхідно більше незаміщеної ксилози для гідролізу АХ
Вибірковість щодо субстрату	WE-AX/WU-AX типowo > 1	WE-AX/WU-AX типowo < 1
SBD	Часто окремих SBD	Немає типового SBD, але вторинний BD на поверхні
Технічний ефект	Знижувачі в'язкості	Розчинник/ знижувачі в'язкості

Нерозчинний у воді арабіноксилан (WU-AX) у злаків, як показано на фігурі 3, пов'язаний із стабільністю фільтраційного осаду у пивоварні.

5 Концентрація ферулової кислоти (FA) у злаків дуже сильно залежить від тканини. Найбільш висока концентрація була виявлена у матеріалі перикарпію, у той час як концентрація в ендоспермі була набагато нижче. Повідомляли про різні концентрації. Концентрація 2700 мкг/г нерозчинної клітковини, 185 мкг/г розчинної клітковини є вірогідною (Bunzel et al. 2001, Journal of Sc. of food and agriculture, vol. 81, p. 653-60).

10 Якщо представити це у більш широкому контексті, це означає, що FA виявляли тільки раз на кожні 200 молекул ксилози в арабіноксилані у нерозчинній клітковині (WU-AX) і на кожні 2500 ксилоз у розчинній клітковині (WE-AX).

Добре відомим фактом є те, що ксиланози можуть привести до утворення стороннього присмаку в пиві, наприклад, вільна ферулова кислота та 4-VG.

15 Способи

Виходячи з критеріїв, згаданих у таблиці 8+9, більше 15 ксиланаз від Dupont Industrial Biosciences виявили в якості можливих кандидатів. Здійснювали скринінг ксиланаз при затиранні у лабораторних умовах із застосуванням до 30 % ячменю у комбінації із солодом. Серед іншого, відслідковували швидкість розділення затору, рівень пентозану/арабіноксилану і значення в'язкості суслу. Найкращих кандидатів тестували при вивченні на декількох пивоварних заводах у напівпромисловому масштабі для тестування наших гіпотез і зв'язку характеристик ксиланози з функціональними властивостями у пивоварінні. Оптимальну дозу вибраного ксиланазного кандидата тестували у комбінації з β-глюканазою.

Результати і обговорення

25

Таблиця 10

ID зразка	Контроль	Еталон (X+B).	X1	X2	X3
Дин. в'язкість (12°Плато), мПа.с	1,798	1,670	1,801	1,746	1,794
Екстракт (°Плато)	15,1	15,7	15,6	15,2	15,1
Загальний пентозан (мг/л)	1610	1910	2440	2020	1710

30 Пивоваріння на напівпромисловому устаткуванні, при якому доза ферменту була єдиною змінною. Застосування ксиланози, яка є вибірковою щодо WU-AX (X1), привело у результаті до руйнування фільтрувального шару. Ксиланазні кандидати, які є вибілковими щодо WE-AX (еталон, X2, X3), приводили у результаті до низького підвищення тиску. Еталон представляв собою суміш ксиланози + бета-глюканази.

Таблиця 11

Аналіз сусла — дослідження на напівпромисловому устаткуванні

ID зразка	Еталон	X+B	Xh+B
Екстракт (°Плато)	15,70	16,00	15,95
Бета-глюкан у суслі (мг/л)	44	35	25
Дин. в'язкість при 12°Плато (мПа.с)	1,65	1,68	1,68
Загальний пентозан (мг/л)	3540	2970	3010

Таблиця 12

Аналіз альдегіду Штрекера у витриманому пиві

Маркери витримки (пиво прискореної витримки)	Одиниця	Еталон	X+B	Xh+B
2-Me-Pr	частин на мільярд	25	24	22
2-Me-Bu	частин на мільярд	3	2	3
3-Me-Bu	частин на мільярд	9	7	8
Фурфурол	частин на мільярд	113	85	93
Метіонал	частин на мільярд	6	5	6
PheAcal	частин на мільярд	10	9	10
T2N	частин на мільярд	0,022	0,022	0,022

5 Оптимізовані суміші ксиланази, яка є вибірковою щодо WE-AX, застосовували при середній (X) і високій дозі (Xh) у комбінації з β-глюканазою (B) до 20 % ячменю/80 % солоду. Результати вказували на хорошу ефективність розділення затору та відділення пива з низьким ризиком утворення стороннього присмаку і руйнування фільтрувального шару.

Висновок

10 За допомогою даного дослідження було доведено важливість застосування ксиланаз для пивоваріння, причому тих, які є високо вибілковими щодо WE-AX під час затирання. Були досягнуті наступні позитивні ефекти.

- Хороше розділення затору і ефективність фільтрації пива.
- Зведений до мінімуму ризик руйнування фільтрувального шару при фільтруванні пивного сусла.
- 15 • Знижена можливість утворення стороннього присмаку, пов'язаного з розпадом арабіноксиланів.

- Стійкість до надлишкової дози ксиланази.

Ксиланази часто можна застосовувати із значним сприятливим ефектом у комбінації з бета-глюканазами для регулювання розділення.

20 **Приклад 3**

Оцінка комбінацій X3/BglS (що також називаються AtuXyn3/BsuGluS) у випробуваннях з напівпромисловим пивоварінням об'ємом 2 гл.

МАТЕРІАЛ І СПОСОБИ

Експерименти. Ферменти

25 AtuXyn3 (X3)/BsuGluS (BglS) (a): комбінація BglS (глюканаза Bacillus) і X3 (ксиланаза Aspergillus; BglS: 0,50 мг білка/кг крупки і X3:1,50 мг білка/кг крупки).

AtuXyn3 (X3)/BsuGluS (BglS) (b): так само, як і в AtuXyn3 (X3)/BsuGluS (BglS) (a), але з 20 % збільшенням дози X3 для тестування надійності.

Еталон. Еталонний ферментний продукт (Ultraflo® Max) з дозою при 0,20 кг/т крупки.

30 **Сировинний матеріал**

Додатковий матеріал: ячмінь 22 % вага/вага.

Солод: солод Pilsner Chiraz 42,6 % вага/вага, солод Pilsner Quench DMG 35,4 % вага за вагою (вага/вага).

35 Увесь матеріал, який використовували для доведення рН за допомогою кислоти, рівнів кальцію, цинку і гіркоти, був харчовим і його розглядали як стандартні матеріали для пивоваріння.

Рецептура для варіння пива була спрямована на стиль пива у вигляді лагерного пива

міжнародного типу.

Розмелювання

Напівпромисловий 2-вальцевий млин Künzel. Мелений матеріал проходив валки двічі, що імітувало 4-вальцевий млин.

5 Солодова крупка: млин працював при 1,5 мм при першому проходженні і 0,7 мм при другому проходженні валків.

Ячмінна крупка: млин працював при 1,5 мм при першому проходженні і 0,4 мм при другому проходженні валків.

Пивоварня на 2 гл

10 Усе варіння пива базувалося на настійному способі затирання для HGB (пивоваріння при високій густині) і стандартному фільтруванні пивного сусла об'ємом 190 л сусла, спрямованому на досягнення 16°Плато. Під час фільтрування пивного сусла, яке здійснювали при постійному потоці, фіксували перепад тиску (використовували в якості параметра для оцінки ефективності фільтрування пивного сусла). Помел всіх матеріалів для варіння пива здійснювали заздалегідь
15 (24 години) і їх тримали в закритих баддях до контакту з водою. Увесь матеріал вивантажували в заторний казан у межах перших 3 хвилин після початку затирання. Доведення кальцію і рН здійснювали перед додаванням ферменту. Повторно перевіряли рН (20 °С) під час паузи при 52 °С. Нормальність згідно з йодною пробєю підтверджували через 10 хвилин при 72 °С. Фільтрування пивного сусла проводили при 78 °С.

20 Ефективність фільтрування пивного сусла оцінювали щодо постійного потоку при 90 л/година під час першого збору сусла. Потік збільшували до 110 л/година і 130 л/година під час промивання дробини і збору відфільтрованого сусла. Хімічний аналіз проводили на холодному суслі.

Кип'ятіння сусла

25 Кип'ятіння проводили із застосуванням зовнішнього нагрівача з 4-5 % випаровуванням. Екстракти хмелю додавали із самого початку кип'ятіння сусла, прагнучи до 20 BU у кінцевому пиві.

Зброджування об'ємом 50 л

30 Усі зброджування проводили в 50 л циліндроконічних ємностях. Зброджування здійснювали згідно зі стандартними робочими методиками. Засівання здійснювали за допомогою 15×10^6 живих дріжджових клітин/мл. Кількість дріжджів і життєздатність розраховували із застосуванням лічильника Nucleo.

Обробка пива

35 Пластинчастий і рамковий фільтр, що працює при постійному тиску. Оцінку потоку проводили за вагою.

Дані збирали виходячи з 1 і 3 фільтрувальних пластин.

Зниження міцності

Здійснювали зниження міцності всіх видів пива до 5,0 % ABV (об'ємний вміст спирту), що розглядали як міжнародний стандарт лагерного пива.

40 Розлив у пляшки

CO₂ доводили до 5,0 г/л. Усі зразки пива розливали в 33 сантілітрові стандартні пляшки на автоматичній розливній машині McLennon із застосуванням одного вакуумування.

Аналіз пива

Види свіжого пива аналізували із застосуванням GC-MS.

45 Хімічний профіль витримки визначали із застосуванням GC-MS.

Результати і спостереження: затирання.

Затирання проводили за наступної умови.

52 °С протягом 10 хвилин, що імітувало затирання протягом 15-20 хвилин із застосуванням працюючого млина.

50 65 °С протягом 40 хвилин.

72 °С протягом 30 хвилин.

78 °С протягом 10 хвилин.

Здійснювали всі етапи з лінійною зміною на 1 °С. Графічне представлення є наведеним на фігурі 7.

55 Усі випробування проводили з даним режимом затирання, спрямованим на варіння пива при 16°Плато. Не було зауважень, які відносилися до цього етапу процесу.

Результати і спостереження. Фільтрування пивного сусла

60 Фільтрування пивного сусла проводили у пивоварні на 2 гл із завантаженням 150 кг/м². Це було типовим для стандартної роботи пивоварні. Здійснювали регулювання процесу фільтрування пивного сусла як постійного потоку при середньому значенні 100 літрів/година.

Початкова швидкість потоку становила 90 літрів/година зі збільшенням до 130 літрів/година під час збору відфільтрованого сусла. Перепад тиску і потокове вимірювання мутності фіксували для чотирьох варінь пива. Загальне фільтрування пивного сусла і збір сусла проводили протягом приблизно 2 годин.

- 5 Припустили, що випробування X3/BglS (b) і X3/BglS (a) були випробуваннями, які характеризувалися найкращою ефективністю фільтрування пивного сусла, за якими слідували випробування X3/BglS (a) і випробування UF max з найгіршою ефективністю.

Таблиця 13

Зібрані дані під час фільтрування пивного сусла із затору, отримані із чотирьох випробувань

Сусло	UF макс.	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
Завантаження фільтраційного чана (кг/м ³)	153	153	153	153
Час фільтрування (хв.)	154	164	170	154
Перепад тиску (см)	40	30	30	30
Розпушування (# глибоких різань)	1	1	1	1
Мутність (ЕВС)	10	15	10	10
Перше підвищення тиску сусла (см/год.)	40	33	31	30
Час до першого глибокого різання (хв.)	45	60	120	115

- 10 "Перепад тиску" і "перше підвищення тиску сусла" у таблиці вимірювали як см WC (см водяного стовпа), а не як (см) і (см/год.), відповідно.

Результати і спостереження. Аналіз сусла після кип'ятіння

Аналіз холодного сусла продемонстрував подібні результати. Аналіз бета-глюканів показав невелику відмінність між зразками.

- 15

Таблиця 14

Хімічний аналіз холодного сусла

Сусло	UF макс.	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
Екстрактивні речовини (% плато)	16,09	16,05	15,99	16,1
Колір (ЕВС)	9,7	9,3	9,3	9,3
pH	5	5,2	5,2	5,2
Йодна реакція (Є/Немає)	Є	Є	Є	Є
Гркота (BU, ЕВС)	52	51	46	50

Таблиця 15

Аналітичні дані щодо холодного сусла

	UF макс.	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
Бета-глюкан у суслі (мг/л)	49	40	25	30
Дин. в'язкість при 12 °C (мПа.с)	1,888	1,685	1,679	1,686
Пентозан (мг/л)	63,5	63,7	63,5	64,4
Ферулова кислота (мкг/мл)	4,3	3,9	3,8	3,9
4-VG (мкг/мл)	<0,49	<0,49	<0,49	<0,49

(12 °C являють собою 12°Плато); (%Плато можна використовувати взаємозамінно з°Плато).

Результати і спостереження. Зброджування

Аналіз молодого пива наведений у таблиці 16.

- 20

Аналіз молодого пива

Молоде пиво	UF макс.	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
Спирт (% об.)	6,79	6,79	6,7	6,86
Фактичний вміст екстрактивних речовин (% P)	6,28	6	6	6
RDF (%)	63,5	63,7	63,5	64,4
Масова частка сухих речовин у первинному суслі (% P)	16,29	16,25	16,09	16,24
Колір (EBC)	8,3	83,5	-	-
pH	4,4	4,4	4,4	4,4
SO ₂ (частин на мільйон)	7	9	11	10
Гіркота (BU, EBC)	29	28	27	27

5 Аналіз молодого пива продемонстрував високий ступінь подібності між випробуваннями. Усі випробування характеризувалися відносно низькою RDF, але це зазвичай спостерігається при включенні 22 % ячменю, що розраховували на основі ваги за вагою (вага/вага).

Результати і спостереження. Фільтрація пива.

10 Зразки пива фільтрували за допомогою пластинчастого і рамкового фільтра з використанням постійного тиску. Фільтрували два кеги вагою приблизно 15 кг, і дані, що відносяться до фільтрації окремого кега, представлені у таблиці 17. Перший кег фільтрували з використанням 1 фільтрувального шару і другий кег фільтрували з використанням 3 фільтрувальних шарів. Перепад тиску у всіх випадках становив 0,5 бар. Фільтрувальні пластини представляли собою KD7 (20 см x 20 см) від Vegeow.

15 Загальна картина кривих фільтрації виходячи з фільтрацій або з 1, або з 3 фільтрувальними пластинами була однією і тією ж. Ми припускаємо, що задокументовані дані з використанням 1 фільтрувальної пластини могли бути занадто нестабільними для того, щоб продемонструвати дійсне співвідношення відмінностей.

Таблиця 17

Дані, що відносяться до фільтрації кега, від чотирьох впробувань

Фільтрація	UF макс.	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
Швидкість фільтрації – 1 фільтрувальний шар (л/год.)	4,8	5,6	9,9	11,8
Швидкість фільтрації – 3 фільтрувальний шар (л/год.)	77,2	59,6	70,6	105,4

Результати і спостереження. Аналіз кінцевого пива

20 Види пива із випробувань аналізували згідно зі стандартними робочими методиками (EBC), і результати представлені у таблиці 18.

Таблиця 18

Аналіз кінцевого пива

Витримане пиво	UF макс.	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
Спирт (%)	4,82	4,89	5,01	4,92
Фактичний вміст екстрактивних речовин (% P)	4,5	4,6	4,6	4,4
RDF (%)	63,2	63,4	63,8	64,3
Масова частка сухих речовин у первинному суслі (% P)	11,85	11,99	12,19	11,89
Колір (EBC)	4,8	4,9	5	5
pH	4,4	4,4	4,4	4,4
SO ₂ (частин на мільйон)	13	13	10	6

Аналіз кінцевого пива

Витримане пиво	UF макс.	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
Гіркота (BU, EBC)	22	22	20	18
Мутність (EBC)	0,43	0,4	0,38	0,4
Загальна мутність - при 60 °C протягом 5 дн. (EBC)	8,6	12,9	7,3	6,2
CO ₂ (г/л)	4,9	5,3	5,1	5,2
Діацетил (частин на мільйон)	12	11	8	10
Піностійкість (с)	107	111	119	108
Об'єм піни (мл)	452	476	460	470

- Результати і спостереження. Альдегіди Штрекера і "маркери витримки" у кінцевому пиві.
- Проводили аналіз як свіжого, так і витриманого пива. Альдегіди Штрекера і "маркери витримки і теплової обробки" (2-Ме-Pr (2-метилпропаналь), 2-Ме-Вu (2-метилбутаналь), 3-Ме-Вu (3-метилбутаналь), фурфурол, метіонал, PheAcal (фенілацетальдегід) і T2N (транс-2-ноненаль)) аналізували за допомогою GC-MS як у свіжому, так і у витриманому пиві. Дані із аналізу свіжого пива представлені в таблиці 19.

Таблиця 19

Аналіз альдегідів Штрекера у свіжому пиві. Маркери теплової обробки і витримки (фурфурол і транс-2-ноненаль) використовували у якості контрольного зразка

Маркери витримки (свіже пиво)	UF макс.	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
2-МЕ-Pr (частин на мільярд)	5	5	5	6
2-МЕ-Вu (частин на мільярд)	2	2	2	2
3-МЕ-Вu (частин на мільярд)	6	6	6	6
Фурфурол (частин на мільярд)	10	11	11	10
Метіонал (частин на мільярд)	4	4	4	4
PheAcal (частин на мільярд)	6	6	6	7
T2N (частин на мільярд)	0,0011	0,005	0,004	0,006

- 10 Види пива із випробувань інкубували при 37 °C протягом 2 тижнів перед аналізом альдегідів Штрекера. Дані для зразків витриманого пива представлені у таблиці 20.

Таблиця 20

Аналіз альдегідів Штрекера у витриманому пиві. Маркери теплової обробки і витримки (фурфурол і транс-2-ноненаль) використовували в якості контрольного зразка

Маркери витримки (пиво прискореної витримки)	UF макс.	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
2-МЕ-Pr (частин на мільярд)	25	23	22	26
2-МЕ-Вu (частин на мільярд)	3	3	3	2
3-МЕ-Вu (частин на мільярд)	9	7	7	8
Фурфурол (частин на мільярд)	111	92	93	78
Метіонал (частин на мільярд)	6	5	6	6
PheAcal (частин на мільярд)	10	9	9	10
T2N (частин на мільярд)	0,0017	0,022	0,022	0,022

- 15 Дані, представлені у таблиці 20, продемонстрували очікуване збільшення рівня альдегідів Штрекера. Збільшення вмісту фурфуролу і транс-2-ноненалю досягало очікуваного рівня.

Висновок

Виходячи з експериментів у напівпромисловому масштабі, ми можемо зробити висновок, що співвідношення BglS і X3, які тестували у даному експерименті, продемонстрували такий же хороший або навіть кращий результат, ніж еталонний UltraFlo Max при пивоварінні у

напівпромислового масштабі.

Результати є несподіваними, якщо розглядати їх з урахуванням використовуваного складного сировинного матеріалу, а саме включення 22 % ячменю в комбінації із солодом, що містить 300 мг/л β-глюкану. Ефективність спостерігали не тільки щодо результатів розділення затору, але також щодо фільтрації пива. Через низьке розчинення матеріалу клітинних стінок при застосуванні BREW2 (дані, що відносяться до пентозану) можна зафіксувати більш низький рівень матеріалу клітинних стінок, який може привести до проблем з якістю, пов'язаних із небажаним смаком і стабільністю.

В остаточному підсумку, можна зробити висновок, що, як виявляється, 20 % збільшення дози ксиланазного компонента в X3/Bgls (b) не справляє ніякого впливу на будь-який із оцінюваних параметрів, що вказує на те, що X3/Bgls (a) є надійною комбінацією ферментів.

Послідовності

AtuXyn3, *Aspergillus tubigenis* (SEQ ID NO:1), 302 амінокислоти

QASVSDTKFKAHGKKYLGNIGDQYTLTKNSKTPAIKADFGALTPENSMKWDATEPSRGQFSFSG
 15 SDYLVNFAQSNNKLIRGHTLVWHSQLPWSVQAITDKNTLIEVMKNHITVVMQHYKGGKIYAWDVVNEIF
 NEDGSLRDSVIFYQVIGEDYVRIAFETARAADPNAKLYINDYNLDSASYPKLTGMVSHVKKWIEAGIPID
 GIGSQTHLSAGGGAGISGALNALAGAGTKEIAVTELDIAGASSTDYVEVVEACLQPKCIGITVWGVAD
 PDSWRSSSTPLLFDSNPNPKPAYTAIANAL

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

20 AGLNTAAKAIGLYFGTATDNPELSDTAYETQLNNTQDFGQLTPANSMKWDATEPEQNVFTFSAGDQ
 IANLAKANGQMLRCHNLVWYNQLPSWVTSGSWTNETLLAAMKNHITNVVTHYKGCYAWDVVNEAL
 NDDGTYRSNVFYQYIGEAYIPIAFATAAAADPNAKLYINDYNIEYPGAKATAAQNVLKLVQSYGARIDG
 VGLQSHFIVGETPSTSSQQQNMAAFTALGVEVAITELDIRMQLPETEALLTQQATDYQSTVQACANTK
 GCVGITVWDWTDKYSWVPSTFSGYGDACPWDANYQKKPAYEGILTGLGQTVTSTTYIISPTTSVGTG
 25 TTTSSGGSGGTTGVAQHWEQCGGLGWTGPTVCASGYTCTVINEYYSQCL

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

EPIEPRQASVSDTKFKAHGKKYLGNIGDQYTLTKNSKTPAIKADFGALTPENSMKWDATEPSRG
 QFSFSGSDYLVNFAQSNNKLIRGHTLVWHSQLPWSVQSITDKNTLIEVMKNHITVVMQHYKGGKIYAWD
 VVNEIFNEDGSLRDSVIFYKVIGEDYVRIAFETARAADPNAKLYINDYNLDSASYPKLTGMVSHVKKWIA
 30 AGIPIDGIGSQTHLSAGGGAGISGALNALAGAGTKEIAVTELDIAGASSTDYVEVVEACLNQPKCIGITV
 WGVADPDSWRSSSTPLLFDSNPNPKPAYTAIANAL

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

MVGLLSITAALAATVLPNIVSAVGLDQAAVAKGLQYFGTATDNPELTDIPYVTQLNNTADFGQITPG
 NSMKWDATEPSQGTFTFTKGDVIADLAEGNGQYLRCHTLVWYNQLPSWVTSGTWTNATLTAALKNH
 35 ITNVSHYKGLKCLHWDVVNEALNDDGTYRTNIFYTTIGEAYIPIAFAAAAAADPDAKLFYNDYNLEYGG
 AKAASARAIQVLKVNAGAKIDGVLQAHFVGTVPSTSSLSVLSQFTALGVEVAYTEADVRILLPTTA
 TTLAQSSDFQALVQSCVQTTGCVGFTIWDWTDKYSWVPSTFSGYGAALPWDENLVKKPAYNGLLA
 GMGVTVTTTTTTTTATATGKTTTTTTGATSTGTTAAHWGQCGGLNWSGPTACATGYTCTYVNDYYS
 QCL

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

MKANVILCLLAPLVAALPTETIHLDPELAALRANLTERADLWDRQASQSIDQLIKRKGKLYFGTAT
 DRGLLQREKNAAIQADLGQVTPENSMKWQSLNNGQQLNWGDADYLVNFAQQNGKSIRGHTLIWH
 SQLPAWVNNINNADTLRQVIRTHVSTVVGRYKGIKIRAWDVVNEIFNEDGTLRSSFVSRLLGEEFVSI
 45 RAARDADPSARLYINDYNLDRANYGKVNGLKTYVSKWISQGVPIIDGIGSQSHLSGGGGSGTLGALQQ
 LATVPVTELAITELDIQGAPTTDYTQVVQACLSVSKCVGITVWGISDKDSWRASNPLLF DANFNPKPA
 YNSIVGILQ

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

QCIPGTGYNNGYFYSYWNDGHGGVTYCNGPGGQFSVNWSNSGNFVGGKGWQPGTKNRVIN
 FSGSYNPNNGNSYLSVYGWSRNPPIEYIYVENFGTYNPSTGATKLGEVTS DGSVYDIYRTQRVNQPSII
 50 GTATFYQYWSVRRNHRSSGSVNTANHFNAWAQQGLTLGTMDYQIVAVEGYFSSGSASITVSD

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

QTGGSFFDPFNGYNSGFVQKADGYSNGNMFNCTWRANNVSMSTSLGEMRLALTSPAYNKFDCCG
 ENRSVQTYGYGLYEVRMKPAKNTGIVSSFFTYTGPTDGTWPWEIDIEFLGKDTTKVQFNYYTNGAGN
 HEKIVDLGFDAANAYHTYAFDWQPNISIKWYVDGQLKHTATNQIPTTPGKIMMNLWNGTGVDEWLGS
 55 YNGVNPLYAHYDWWRYTKK

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

APVKEKGIKKRASPFQWFGSNESGAEFGNINIPGVEGTDYTFPNTSAIQILIDQGMNIFRVPFLME
 RMVNPQMTGPVDSAYFQGYVQVINYITSHGASAVIDPHNFGRYNNIISPSDFQTFWHTIASNFADN
 DNVIFDTNNEYHDMDESLVVQLNQAIDGIRAAGATSQYIFVEGNSWTGAWTWTQVNDAMANLTD
 60 QNKIVYEMHQYLDSDSGSTSDQCVNSTIGQDRVESATAWLKQNGKKAILGEYAGGANSVCETA
 VTG

MLDYLANNTDVWTGAIWWAAGPWWGDYIFSMEPPSGIAYEQVLPPLLQPYL

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

DDYSVVEEHGQLSISNGELVNERGEQVQLKGMSSHGLQWYQQFVNYESMKWLRDDWGITVFR
 AAMYTSSGGYIDDPVKEKVKETVEAAIDLGIYVIIDWHILSDNDPNYKKEAKDFFDEMSELYGDYPNV
 5 IYEIANEPNGSDVTWDNQIKPYAEEVIPVIRDNDPNIVIVGTGTWSQDVHHAADNQLADPNVMYAFH
 FYAGTHGQNLRDQVDYALDQGAIFVSEWGTSAATGDGGVFLDEAQVWIDFMDERNLSWANWSLT
 HKDESSAALMPGANPTGGWTEAELSPSGTFVREKIREASASIPSDPTPPSDPGEPPDGEPPDTPPSD
 PGEYPAWDSNQIYTNEIVYHNGQLWQAKWWTQNQEPGDPYGPWEPLKSDPDSGEPDTPPSDPG
 EYPAWDSNQIYTNEIVYHNGQLWQAKWWTQNQEPGDPYGPWEPLN

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

QQTWVGQCGGIGWVGSGPTNCAPGSACSTLNPPYYAQCIPGATTITSTRPPSGPTTTTRATSTSSS
 TPPTSSGVRFAGVNIAGFDGCTTDGTCVTSKVIYVPLKNFTGSNNYPDGIGQMQLHFVNDGDMTIFRL
 PVGWQYLVNNLGGNLDSTSISKYDQLVQGCLSLGAYCIVDIHNYARWNGGIQGGPTNAQFTSLW
 15 SQLASKYASQSRVWFGIMNEPHDVNINTWAATVQEVVTAIRNAGATSQFISLPGNDWQSAGAFISDG
 SAAALSQVTNPDGSTTNLIFDVHKYLDSDNSGTHAECTTNIDGAFSPLATWLRQNNRQAILTETGGG
 NVQSCIQDMCQQIQYLNQNSDVYLGYYVVGWAGSFDSTYVLTETPTGSGNSWTDTSLVSSCLARK

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

QTSCDQWATFTGNGYTVSNLWLGASAGSGFGCVTAVSLSGGASWHADWQWSSGQNNVKS
 QNSQIAIPQKRTVNSISSMPTTASWSYSGSNIRANVAYDLFTAANPNHVITYSGDYELMIWLKYGDIG
 20 PIGSSQGTNVGGQSWTLYYGYNGAMQVYSFVAQTNTTNYSGDVKNFFNYLRDNKGYNAAGQYVL
 SYQFGTEPFTGSGTLNVAWTASIN

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

HGHINDIVINGVWYQAYDPTTFPYESNPPVVGWTAADLDNGFVSPDAYQNPDIICHKNATNAKG
 HASVKAGDTILFQWVVPVWPHPGPIVDYLANCNGDCETVDKTTLEFFKIDGVGLLSSGGDPGTWASDV
 25 LISNNNTWVVKIPDNLAPGNYVLRHEIIALHSAGQANGAQNYPQCFFNIAVSGSGSLQPSGVLGTDLYH
 ATDPGVLINIYTSPLNYIIPGPTVVSGLPSTVAQSSAATATASATVPGGGSGPSTRTTTTARTTQASS
 RPSSTPPATTSAPAGGPTQTLYGQCGGSGYSGPTRCAPPATCSTNPYYAQCLN

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

AFSWKNVKGGLGGGGFVPGIIFHPKTKGVAYARTDIGGLYRLNADDSWTAVTDGIADNAGWHNW
 30 GIDAVALDPQDDQKVYAAVGMYSNSWDPNSGAIIRSSDRGATWSFTNLPFKVGGNMPGRGAGERLA
 VDPANSNIIYFGARSGNGLWKSTDGGVTFKSVSSFTATGTIYIPDPSDSNGYNSDKQGLMWVTFDSTS
 STTGGATSRIFVGTADNITASVYVSTNAGSTWSAVPGQPGKYFPHKAKLQPAEKALYLTYSWWPDAQ
 LFRSTDGTTWSPIWAWASYPTETYYYYSISTPKAPWIKNNFIDVTSESPDGLIKRLGWMIESLEIDPT
 DSNHWLYGTGMTIFGGHDLTNWDRHNVSISQSLADGIEEFSVQDLASAPGGSSELLAAVGGDDNGFTFA
 35 SRNDLGTSPQTVWATPTWATSTSVDYAGNSKSVVRVGNATAGTQQVAISSDGGATWSIDYAADTSM
 NNGTVAYSADGDTILWSTASSGVQRSQGSFASVSSLPAGAVIASDKKTNVSVFYAGSGSTFYVSKD
 TGSSFTTRGPKLGSAGTIRDIAAHPTTAGTLYVSTDVGFIRSTDSGTTFGQVSTALNTYQIALGVGSGS
 NWNLYAFGTGPSGARLYASGDSGASWTDIQGSQGFSGSIDSTKVAGSGSTAGQVYVGTNGRGVFYA
 QGTVGGGTGGTSSSTKQSSSSTSSASSSTTLRSSVVSTTRASTVTSRTSSAAGPTGSGVAGHYAQ
 40 CGGIGWTGPTQCVAPYVCQKQNDYYYQCV

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

HGQVQNFTINGQYNQGFILDYYYQKQNTGHFPNVAGWYAEDLDLGFISPDQYTTTPDIVCHKNA
 45 PGAISATAAAGSNIVFQWPGVWPHYPYGPVIVYVECSGSCCTTVNKNLNRWVKIQEAGINYNTQVWA
 QQDLINQGNKWTVKIPSSLRPGNYVFRHELLAAHGASSANGMQNYPCVNIAVTGSGTKALPAGTPA
 TQLYKPTDPGILFNPTTITSYTIPGPALWQG

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

GKIKYLGAIPGIDFGCDIDGSCPTDTSSVPLLSYKGGDGAGQMKHFAEDDGLNVFRISATWQFV
 LNNTVDGKLDLWGSYNKVVNACLETGAYCMIDMHNFAFYNGGIIQGGVSDDIFVDLWVQIAKYY
 EDNDKIIIFGLMNEPHDLDEIWAQTCQKVVTAIRKAGATSMILLPGTNFASVETYVSTGSAEALGKITN
 50 PDGSTDLLYFDVHKYLDINNSGSHAECTTDNVDAFNDFADWLRQNKRAISETGASMEPSCMTAFC
 AQNKAISENSDVYIGFVWGWGAGSFDTSYILTLTPLGKPGNYTDNKLMECILDQFTLDEKYRPTPTSIS
 TAAEETATATATSDGDAPSTTKPIFREETASPTPNAVTKPSPDTSDDSSDDDKDSAASMSAAGLTGTVL
 FTVAALGYMLVAF

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

MKRSISIFITCLLITLLTMGGMIASPASAAGTKTPVAKNGQLSIKGTQLVNRDGVKAVQLKGISSHGL
 55 QWYGEYVKNDSLKWLRDDWGITVFRAMYADGGYIDNPSVKNKVKEAVEAAKELGIYVIIDWHILND
 GNPQNQKEKAKEFFKEMSSLYGNTPNVIYEIANEPNGDVNWKRDIKPYAEEVISVIRKNDPNDIIIVGT
 GTWSQDVNDAADDQLKDANVMYALHFYAGTHGQFLRDKANYALSKGAPIFVTEWGTSDASNGGVL
 FLDQSREWLKYLDSKTISWVNWNLSDKQESSALKPGASKTGGWRLSDLASAGTFVRENILGTKDST
 60 KDIPETPSKDKPTQENGISVQYRAGDGSMMNSNQIRPQLQIKNNGNTTVDLKDVTARYWYKAKNKGQN

FDCDYAQIGCGNVTHKFVTLHKPKQGADTYLELGFKNGTLAPGASTGNIQLRLHND DWSNYAQSGD
YSFFKSNTFKTTKKITLYDQGKLIWGTEPN

Вариант ксиланази BsuXyn3, Bacillus subtilis (SEQ ID NO:17)

5 ASTDYWQNWTFGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPN
GNGYLTLYGWTRSPLIEYYVVD SWGTYRPTGTYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDDTTFTQY
WSVRQSKRPTGSNATITFSNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSSNVTW

Вариант ксиланази BsuXyn4, Bacillus subtilis (SEQ ID NO:18)

10 ASTDYWQNWTDGYGIVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPN
GNGYLTLYGWTRSPLIEYYVVD SWGTYRPTGTYKGTVYSDGGWYDIYTATRDNAPSIDGDFTTFTQY
WSVRQSKRPTGSNATITFSNHVNAWRSHGMDLGSNWAYQVMATEGYLSSGSSNVTW

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ДЮПОН НУТРИШЕН БАЙОСАЙЕНСІЗ ЕЙПІЕС

<120> ферменти

<130> 18733PCT00

<160> 18

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1

<211> 302

<212> БІЛОК

<213> *Aspergillus tubigensis*

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Lys Trp Ile Glu Ala Gly Ile Pro Ile Asp Gly Ile Gly Ser Gln

SEQUENCE LIST - CONT

```

195
200
205

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

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

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

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

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

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

<210> 2
<211> 386
<212> BLANK
<213> Geosmithia emersonii

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

890004EMMK_SeqList.txt

Tyr Gln Tyr Ile Gly Glu Ala Tyr Ile Pro Ile Ala Phe Ala Thr Ala
 145 150 155 160
 Ala Ala Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Tyr Asn Asp Tyr Asn Ile
 165 170 175
 Glu Tyr Pro Gly Ala Lys Ala Thr Ala Ala Gln Asn Leu Val Lys Leu
 180 185 190
 Val Gln Ser Tyr Gly Ala Arg Ile Asp Gly Val Gly Leu Gln Ser His
 195 200 205
 Phe Ile Val Gly Glu Thr Pro Ser Thr Ser Ser Gln Gln Gln Asn Met
 210 215 220
 Ala Ala Phe Thr Ala Leu Gly Val Glu Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp
 225 230 235 240
 Ile Arg Met Gln Leu Pro Glu Thr Glu Ala Leu Leu Thr Gln Gln Ala
 245 250 255
 Thr Asp Tyr Gln Ser Thr Val Gln Ala Cys Ala Asn Thr Lys Gly Cys
 260 265 270
 Val Gly Ile Thr Val Trp Asp Trp Thr Asp Lys Tyr Ser Trp Val Pro
 275 280 285
 Ser Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Asp Ala Cys Pro Trp Asp Ala Asn Tyr
 290 295 300
 Gln Lys Lys Pro Ala Tyr Glu Gly Ile Leu Thr Gly Leu Gly Gln Thr
 305 310 315 320
 Val Thr Ser Thr Thr Tyr Ile Ile Ser Pro Thr Thr Ser Val Gly Thr
 325 330 335
 Gly Thr Thr Thr Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Thr Thr Gly Val Ala
 340 345 350
 Gln His Trp Glu Gln Cys Gly Gly Leu Gly Trp Thr Gly Pro Thr Val
 355 360 365
 Cys Ala Ser Gly Tyr Thr Cys Thr Val Ile Asn Glu Tyr Tyr Ser Gln
 370 375 380
 Cys Leu
 385
 <210> }
 <211> 308

8900048NUK_SeqList.txt

<212> 6180K

<213> Aspergillus tubigenensis

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

B900046NRK_SeqList.txt

Glu Val Val Glu Ala Cys Leu Asn Gln Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr
 260 265 270
 Val Trp Gly Val Ala Asp Pro Asp Ser Trp Arg Ser Ser Ser Thr Pro
 275 280 285
 Leu Leu Phe Asp Ser Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala Tyr Thr Ala Ile
 290 295 300
 Ala Asn Ala Leu
 305
 <210> 4
 <211> 406
 <212> BIRNK
 <213> Aspergillus aculeatus
 <400> 4
 Met Val Gly Leu Leu Ser Ile Thr Ala Ala Leu Ala Ala Thr Val Leu
 1 5 10 15
 Pro Asn Ile Val Ser Ala Val Gly Leu Asp Gln Ala Ala Val Ala Lys
 20 25 30
 Gly Leu Gln Tyr Phe Gly Thr Ala Thr Asp Asn Pro Glu Leu Thr Asp
 35 40 45
 Ile Pro Tyr Val Thr Gln Leu Asn Asn Thr Ala Asp Phe Gly Gln Ile
 50 55 60
 Thr Pro Gly Asn Ser Met Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Gln Gly
 65 70 75 80
 Thr Phe Thr Phe Thr Lys Gly Asp Val Ile Ala Asp Leu Ala Glu Gly
 85 90 95
 Asn Gly Gln Tyr Leu Arg Cys His Thr Leu Val Trp Tyr Asn Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Trp Val Thr Ser Gly Thr Trp Thr Asn Ala Thr Leu Thr Ala
 115 120 125
 Ala Leu Lys Asn His Ile Thr Asn Val Val Ser His Tyr Lys Gly Lys
 130 135 140
 Cys Leu His Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Leu Asn Asp Asp Gly Thr
 145 150 155 160
 Tyr Arg Thr Asn Ile Phe Tyr Thr Thr Ile Gly Glu Ala Tyr Ile Pro
 165 170 175

B9000483WKK_SeqLst.txt

Ile Ala Phe Ala Ala Ala Ala Ala Ala Asp Pro Asp Ala Lys Leu Phe
 180 185 190

Tyr Asn Asp Tyr Asn Leu Glu Tyr Gly Gly Ala Lys Ala Ala Ser Ala
 195 200 205

Arg Ala Ile Val Gln Leu Val Lys Asn Ala Gly Ala Lys Ile Asp Gly
 210 215 220

Val Gly Leu Gln Ala His Phe Ser Val Gly Thr Val Pro Ser Thr Ser
 225 230 235 240

Ser Leu val Ser val Leu Gln Ser Phe Thr Ala Leu Gly val Glu val
 245 250 255

Ala Tyr Thr Glu Ala Asp Val Arg Ile Leu Leu Pro Thr Thr Ala Thr
 260 265 270

Thr Leu Ala Gln Gln Ser Ser Asp Phe Gln Ala Leu val Gln Ser Cys
 275 280 285

val Gln Thr Thr Gly Cys val Gly Phe Thr Ile Trp Asp Trp Thr Asp
 290 295 300

Lys Tyr Ser Trp Val Pro Ser Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Ala Ala Leu
 305 310 315 320

Pro Trp Asp Glu Asn Leu Val Lys Lys Pro Ala Tyr Asn Gly Leu Leu
 325 330 335

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

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

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

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

Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu
 405

- <210> 5
- <211> 347
- <212> B1700K
- <213> Trichoderma reesei
- <400> 5

Met Lys Ala Asn Val Ile Leu Cys Leu Leu Ala Pro Leu val Ala Ala

1 5 890004EMUK_Seq1.st.txt 15
 10
 Leu Pro Thr Glu Thr Ile His Leu Asp Pro Glu Leu Ala Ala Leu Arg
 20 25 30
 Ala Asn Leu Thr Glu Arg Thr Ala Asp Leu Trp Asp Arg Gln Ala Ser
 35 40 45
 Gln Ser Ile Asp Gln Leu Ile Lys Arg Lys Gly Lys Leu Tyr Phe Gly
 50 55 60
 Thr Ala Thr Asp Arg Gly Leu Leu Gln Arg Glu Lys Asn Ala Ala Ile
 65 70 75 80
 Ile Gln Ala Asp Leu Gly Gln Val Thr Pro Glu Asn Ser Met Lys Trp
 85 90 95
 Gln Ser Leu Glu Asn Asn Gln Gly Gln Leu Asn Trp Gly Asp Ala Asp
 100 105 110
 Tyr Leu Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Lys Ser Ile Arg Gly His
 115 120 125
 Thr Leu Ile Trp His Ser Gln Leu Pro Ala Trp Val Asn Asn Ile Asn
 130 135 140
 Asn Ala Asp Thr Leu Arg Gln Val Ile Arg Thr His Val Ser Thr Val
 145 150 155 160
 Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Arg Ala Trp Asp Val Val Asn Glu
 165 170 175
 Ile Phe Asn Glu Asp Gly Thr Leu Arg Ser Ser Val Phe Ser Arg Leu
 180 185 190
 Leu Gly Glu Glu Phe Val Ser Ile Ala Phe Arg Ala Ala Arg Asp Ala
 195 200 205
 Asp Pro Ser Ala Arg Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Asn Leu Asp Arg Ala
 210 215 220
 Asn Tyr Gly Lys Val Asn Gly Leu Lys Thr Tyr Val Ser Lys Trp Ile
 225 230 235 240
 Ser Gln Gly Val Pro Ile Asp Gly Ile Gly Ser Gln Ser His Leu Ser
 245 250 255
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Thr Leu Gly Ala Leu Gln Gln Leu Ala Thr
 260 265 270
 Val Pro Val Thr Glu Leu Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Gln Gly Ala

275 890004EMUK_Seq1.st.txt 280 285

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

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

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

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

<210> 6
<211> 191
<212> B190K
<213> Trichoderma reesei

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

B90004EMUK_SeqLst.txt

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

<210> 7
 <211> 214
 <212> B190K
 <213> Bacillus subtilis

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Arg Tyr Thr Lys Lys
 210

890004ENUK_seqLst.txt

```

<210> 8
<211> 116
<212> ENUK
<213> Geosmithia emersonii

<400> 8
Ala Pro Val Lys Glu Lys Gly Ile Lys Lys Arg Ala Ser Pro Phe Gln
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

890004ENK_SeqList.txt

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

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

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

Trp Trp Gly Asp Tyr Ile Phe Ser Met Glu Pro Pro Ser Gly Ile Ala
 290 295 300

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

<210> 9
 <211> 441
 <212> 6180K
 <213> Bacillus subtilis
 <400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Ile Arg Asp Asn Asp Pro Asn Asn Ile Val Ile Val Gly Thr Gly

890004EMK_SeqList.txt
170

165
 Thr Trp Ser Gln Asp Val His His Ala Ala Asp Asn Gln Leu Ala Asp
 180 185
 Pro Asn Val Met Tyr Ala Phe His Phe Tyr Ala Gly Thr His Gly Gln
 195 200 205
 Asn Leu Arg Asp Gln Val Asp Tyr Ala Leu Asp Gln Gly Ala Ala Ile
 210 215 220
 Phe Val Ser Glu Trp Gly Thr Ser Ala Ala Thr Gly Asp Gly Gly Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Asp Glu Ala Gln Val Trp Ile Asp Phe Met Asp Glu Arg Asn
 245 250 255
 Leu Ser Trp Ala Asn Trp Ser Leu Thr His Lys Asp Glu Ser Ser Ala
 260 265 270
 Ala Leu Met Pro Gly Ala Asn Pro Thr Gly Gly Trp Thr Glu Ala Glu
 275 280 285
 Leu Ser Pro Ser Gly Thr Phe Val Arg Glu Lys Ile Arg Glu Ser Ala
 290 295 300
 Ser Ile Pro Pro Ser Asp Pro Thr Pro Pro Ser Asp Pro Gly Glu Pro
 305 310 315 320
 Asp Pro Gly Glu Pro Asp Pro Thr Pro Pro Ser Asp Pro Gly Glu Tyr
 325 330 335
 Pro Ala Trp Asp Ser Asn Gln Ile Tyr Thr Asn Glu Ile Val Tyr His
 340 345 350
 Asn Gly Gln Leu Trp Gln Ala Lys Trp Trp Thr Gln Asn Gln Glu Pro
 355 360 365
 Gly Asp Pro Tyr Gly Pro Trp Glu Pro Leu Lys Ser Asp Pro Asp Ser
 370 375 380
 Gly Glu Pro Asp Pro Thr Pro Pro Ser Asp Pro Gly Glu Tyr Pro Ala
 385 390 395 400
 Trp Asp Ser Asn Gln Ile Tyr Thr Asn Glu Ile Val Tyr His Asn Gly
 405 410 415
 Gln Leu Trp Gln Ala Lys Trp Trp Thr Gln Asn Gln Glu Pro Gly Asp
 420 425 430
 Pro Tyr Gly Pro Trp Glu Pro Leu Asn
 ...

8900046HUK_Seql.st.txt
440

435

```

<210> 10
<211> 397
<212> 6190K
<213> Trichoderma reesei

<400> 10
Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Ser Gly Pro
1
1
5
10
15
Thr Asn Cys Ala Pro Gly Ser Ala Cys Ser Thr Leu Asn Pro Tyr Tyr
20
25
30
Ala Gln Cys Ile Pro Gly Ala Thr Thr Ile Thr Thr Ser Thr Arg Pro
35
40
45
Pro Ser Gly Pro Thr Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ser Thr Ser Ser Ser
50
55
60
Thr Pro Pro Thr Ser Ser Gly Val Arg Phe Ala Gly Val Asn Ile Ala
65
70
75
80
Gly Phe Asp Phe Gly Cys Thr Thr Asp Gly Thr Cys Val Thr Ser Lys
85
90
95
Val Tyr Pro Pro Leu Lys Asn Phe Thr Gly Ser Asn Asn Tyr Pro Asp
100
105
110
Gly Ile Gly Gln Met Gln His Phe Val Asn Asp Asp Gly Met Thr Ile
115
120
125
Phe Arg Leu Pro Val Gly Trp Gln Tyr Leu Val Asn Asn Asn Leu Gly
130
135
140
Gly Asn Leu Asp Ser Thr Ser Ile Ser Lys Tyr Asp Gln Leu Val Gln
145
150
155
160
Gly Cys Leu Ser Leu Gly Ala Tyr Cys Ile Val Asp Ile His Asn Tyr
165
170
175
Ala Arg Trp Asn Gly Gly Ile Ile Gly Gln Gly Gly Pro Thr Asn Ala
180
185
190
Gln Phe Thr Ser Leu Trp Ser Gln Leu Ala Ser Lys Tyr Ala Ser Gln
195
200
205
Ser Arg Val Trp Phe Gly Ile Met Asn Glu Pro His Asp Val Asn Ile
210
215
220
Asn Thr Trp Ala Ala Thr Val Gln Glu Val Val Thr Ala Ile Arg Asn
225
230
235
240

```

890004ENUK_Seq1.st.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11
 <211> 218
 <212> BIROK
 <213> Trichoderma reesei

<400> 11

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

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

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

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

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

890004ENUK_SeqLst.txt

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

 <210> 12
 <211> 322
 <212> GIBON
 <213> Trichoderma reesei

 <400> 12
 His Gly His Ile Asn Asp Ile Val Ile Asn Gly Val Trp Tyr Gln Ala
 1 5 10 15
 Tyr Asp Pro Thr Thr Phe Pro Tyr Glu Ser Asn Pro Pro Ile Val Val
 20 25 30
 Gly Trp Thr Ala Ala Asp Leu Asp Asn Gly Phe Val Ser Pro Asp Ala
 35 40 45
 Tyr Gln Asn Pro Asp Ile Ile Cys His Lys Asn Ala Thr Asn Ala Lys
 50 55 60
 Gly His Ala Ser Val Lys Ala Gly Asp Thr Ile Leu Phe Gln Trp Val
 65 70 75 80
 Pro Val Pro Trp Pro His Pro Gly Pro Ile Val Asp Tyr Leu Ala Asn
 85 90 95

890004ENUK_SeqList.txt

Cys Asn Gly Asp Cys Glu Thr Val Asp Lys Thr Thr Leu Glu Phe Phe
 100 105 110

Lys Ile Asp Gly Val Gly Leu Leu Ser Gly Gly Asp Pro Gly Thr Trp
 115 120 125

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

Pro Asp Asn Leu Ala Pro Gly Asn Tyr Val Leu Arg His Glu Ile Ile
 145 150 155 160

Ala Leu His Ser Ala Gly Gln Ala Asn Gly Ala Gln Asn Tyr Pro Gln
 165 170 175

Cys Phe Asn Ile Ala Val Ser Gly Ser Gly Ser Leu Gln Pro Ser Gly
 180 185 190

Val Leu Gly Thr Asp Leu Tyr His Ala Thr Asp Pro Gly Val Leu Ile
 195 200 205

Asn Ile Tyr Thr Ser Pro Leu Asn Tyr Ile Ile Pro Gly Pro Thr Val
 210 215 220

Val Ser Gly Leu Pro Thr Ser Val Ala Gln Gly Ser Ser Ala Ala Thr
 225 230 235 240

Ala Thr Ala Ser Ala Thr Val Pro Gly Gly Gly Ser Gly Pro Thr Ser
 245 250 255

Arg Thr Thr Thr Thr Ala Arg Thr Thr Gln Ala Ser Ser Arg Pro Ser
 260 265 270

Ser Thr Pro Pro Ala Thr Thr Ser Ala Pro Ala Gly Gly Pro Thr Gln
 275 280 285

Thr Leu Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ser Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Arg
 290 295 300

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

Leu Asn

<210> 11
 <211> 761
 <212> STUBK
 <213> Trichoderma reesei

<400> 11

Ala Phe Ser Trp Lys Asn Val Lys Leu Gly Gly Gly Gly Gly Phe Val

890004EMMK_SeqLst.txt
10

1 5 15
 Pro Gly Ile Ile Phe His Pro Lys Thr Lys Gly Val Ala Tyr Ala Arg
 20 25 30
 Thr Asp Ile Gly Gly Leu Tyr Arg Leu Asn Ala Asp Asp Ser Trp Thr
 35 40 45
 Ala Val Thr Asp Gly Ile Ala Asp Asn Ala Gly Trp His Asn Trp Gly
 50 55 60
 Ile Asp Ala Val Ala Leu Asp Pro Gln Asp Asp Gln Lys Val Tyr Ala
 65 70 75 80
 Ala Val Gly Met Tyr Thr Asn Ser Trp Asp Pro Ser Asn Gly Ala Ile
 85 90 95
 Ile Arg Ser Ser Asp Arg Gly Ala Thr Trp Ser Phe Thr Asn Leu Pro
 100 105 110
 Phe Lys Val Gly Gly Asn Met Pro Gly Arg Gly Ala Gly Glu Arg Leu
 115 120 125
 Ala Val Asp Pro Ala Asn Ser Asn Ile Ile Tyr Phe Gly Ala Arg Ser
 130 135 140
 Gly Asn Gly Leu Trp Lys Ser Thr Asp Gly Gly Val Thr Phe Ser Lys
 145 150 155 160
 Val Ser Ser Phe Thr Ala Thr Gly Thr Tyr Ile Pro Asp Pro Ser Asp
 165 170 175
 Ser Asn Gly Tyr Asn Ser Asp Lys Gln Gly Leu Met Trp Val Thr Phe
 180 185 190
 Asp Ser Thr Ser Ser Thr Thr Gly Gly Ala Thr Ser Arg Ile Phe Val
 195 200 205
 Gly Thr Ala Asp Asn Ile Thr Ala Ser Val Tyr Val Ser Thr Asn Ala
 210 215 220
 Gly Ser Thr Trp Ser Ala Val Pro Gly Gln Pro Gly Lys Tyr Phe Pro
 225 230 235 240
 His Lys Ala Lys Leu Gln Pro Ala Glu Lys Ala Leu Tyr Leu Thr Tyr
 245 250 255
 Ser Trp Trp Pro Asp Ala Gln Leu Phe Arg Ser Thr Asp Ser Gly Thr
 260 265 270
 Thr Trp Ser Pro Ile Trp Ala Trp Ala Ser Tyr Pro Thr Glu Thr Tyr

890004ENMK_SeqLSE.txt
280 283

275

Tyr Tyr Ser Ile Ser Thr Pro Lys Ala Pro Trp Ile Lys Asn Asn Phe
290 295 300
Ile Asp Val Thr Ser Glu Ser Pro Ser Asp Gly Leu Ile Lys Arg Leu
305 310 315 320
Gly Trp Met Ile Glu Ser Leu Glu Ile Asp Pro Thr Asp Ser Asn His
325 330 335
Trp Leu Tyr Gly Thr Gly Met Thr Ile Phe Gly Gly His Asp Leu Thr
340 345 350
Asn Trp Asp Thr Arg His Asn Val Ser Ile Glu Ser Leu Ala Asp Gly
355 360 365
Ile Glu Glu Phe Ser Val Gln Asp Leu Ala Ser Ala Pro Gly Gly Ser
370 375 380
Glu Leu Leu Ala Ala Val Gly Asp Asp Asn Gly Phe Thr Phe Ala Ser
385 390 395 400
Arg Asn Asp Leu Gly Thr Ser Pro Gln Thr Val Trp Ala Thr Pro Thr
405 410 415
Trp Ala Thr Ser Thr Ser Val Asp Tyr Ala Gly Asn Ser Val Lys Ser
420 425 430
Val Val Arg Val Gly Asn Thr Ala Gly Thr Gln Gln Val Ala Ile Ser
435 440 445
Ser Asp Gly Gly Ala Thr Trp Ser Ile Asp Tyr Ala Ala Asp Thr Ser
450 455 460
Met Asn Gly Gly Thr Val Ala Tyr Ser Ala Asp Gly Asp Thr Ile Leu
465 470 475 480
Trp Ser Thr Ala Ser Ser Gly Val Gln Arg Ser Gln Phe Gln Gly Ser
485 490 495
Phe Ala Ser Val Ser Ser Leu Pro Ala Gly Ala Val Ile Ala Ser Asp
500 505 510
Lys Lys Thr Asn Ser Val Phe Tyr Ala Gly Ser Gly Ser Thr Phe Tyr
515 520 525
Val Ser Lys Asp Thr Gly Ser Ser Phe Thr Arg Gly Pro Lys Leu Gly
530 535 540
Ser Ala Gly Thr Ile Arg Asp Ile Ala Ala His Pro Thr Thr Ala Gly

B9000MENUN_SeqLst.txt

```

545                               550                               555                               560
Thr Leu Tyr Val Ser Thr Asp Val Gly Ile Phe Arg Ser Thr Asp Ser
565

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

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

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

Ala Ser Trp Thr Asp Ile Gln Gly Ser Gln Gly Phe Gly Ser Ile Asp
625

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

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

Gly Thr Gly Gly Thr Ser Ser Ser Thr Lys Gln Ser Ser Ser Ser Thr
675

Ser Ser Ala Ser Ser Ser Thr Thr Leu Arg Ser Ser Val Val Ser Thr
690

Thr Arg Ala Ser Thr Val Thr Ser Ser Arg Thr Ser Ser Ala Ala Gly
705

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

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

Gln Asn Asp Tyr Tyr Tyr Gln Cys Val
755

<210> 14
<211> 230
<212> B18888
<213> Trichoderma reesei

<400> 14
His Gly Gln Val Gln Asn Phe Thr Ile Asn Gly Gln Tyr Asn Gln Gly
1 5 10 15

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

```

890004EMM_Seqlst.txt

Asn Val Ala Gly Trp Tyr Ala Glu Asp Leu Asp Leu Gly Phe Ile Ser
 35 40 45
 Pro Asp Gln Tyr Thr Thr Pro Asp Ile Val Cys His Lys Asn Ala Ala
 50 55 60
 Pro Gly Ala Ile Ser Ala Thr Ala Ala Ala Gly Ser Asn Ile Val Phe
 65 70 75 80
 Gln Trp Gly Pro Gly Val Trp Pro His Pro Tyr Gly Pro Ile Val Thr
 85 90
 Tyr Val Val Glu Cys Ser Gly Ser Cys Thr Thr Val Asn Lys Asn Asn
 100 105 110
 Leu Arg Trp Val Lys Ile Gln Glu Ala Gly Ile Asn Tyr Asn Thr Gln
 115 120 125
 Val Trp Ala Gln Gln Asp Leu Ile Asn Gln Gly Asn Lys Trp Thr Val
 130 135 140
 Lys Ile Pro Ser Ser Leu Arg Pro Gly Asn Tyr Val Phe Arg His Glu
 145 150 155 160
 Leu Leu Ala Ala His Gly Ala Ser Ser Ala Asn Gly Met Gln Asn Tyr
 165 170 175
 Pro Gln Cys Val Asn Ile Ala Val Thr Gly Ser Gly Thr Lys Ala Leu
 180 185 190
 Pro Ala Gly Thr Pro Ala Thr Gln Leu Tyr Lys Pro Thr Asp Pro Gly
 195 200 205
 Ile Leu Phe Asn Pro Tyr Thr Thr Ile Thr Ser Tyr Thr Ile Pro Gly
 210 215 220
 Pro Ala Leu Trp Gln Gly
 225 230
 <210> 15
 <211> 419
 <212> EMM
 <213> Trichoderma reesei
 <400> 15
 Gly Lys Ile Lys Tyr Leu Gly Val Ala Ile Pro Gly Ile Asp Phe Gly
 1 5 10 15
 Cys Asp Ile Asp Gly Ser Cys Pro Thr Asp Thr Ser Ser Val Pro Leu
 20 25 30

590004EMBL_SeqLst.txt

Leu Ser Tyr Lys Gly Gly Asp Gly Ala Gly Gln Met Lys His Phe Ala
 35 40 45
 Glu Asp Asp Gly Leu Asn Val Phe Arg Ile Ser Ala Thr Trp Gln Phe
 50 55 60
 Val Leu Asn Asn Thr Val Asp Gly Lys Leu Asp Glu Leu Asn Trp Gly
 65 70 75 80
 Ser Tyr Asn Lys Val Val Asn Ala Cys Leu Glu Thr Gly Ala Tyr Cys
 85 90 95
 Met Ile Asp Met His Asn Phe Ala Arg Tyr Asn Gly Gly Ile Ile Gly
 100 105 110
 Gln Gly Gly Val Ser Asp Asp Ile Phe Val Asp Leu Trp Val Gln Ile
 115 120 125
 Ala Lys Tyr Tyr Glu Asp Asn Asp Lys Ile Ile Phe Gly Leu Met Asn
 130 135 140
 Glu Pro His Asp Leu Asp Ile Glu Ile Trp Ala Gln Thr Cys Gln Lys
 145 150 155 160
 Val Val Thr Ala Ile Arg Lys Ala Gly Ala Thr Ser Gln Met Ile Leu
 165 170 175
 Leu Pro Gly Thr Asn Phe Ala Ser Val Glu Thr Tyr Val Ser Thr Gly
 180 185 190
 Ser Ala Glu Ala Leu Gly Lys Ile Thr Asn Pro Asp Gly Ser Thr Asp
 195 200 205
 Leu Leu Tyr Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ile Asn Asn Ser Gly
 210 215 220
 Ser His Ala Glu Cys Thr Thr Asp Asn Val Asp Ala Phe Asn Asp Phe
 225 230 235 240
 Ala Asp Trp Leu Arg Gln Asn Lys Arg Glu Ala Ile Ile Ser Glu Thr
 245 250 255
 Gly Ala Ser Met Glu Pro Ser Cys Met Thr Ala Phe Cys Ala Gln Asn
 260 265 270
 Lys Ala Ile Ser Glu Asn Ser Asp Val Tyr Ile Gly Phe Val Gly Trp
 275 280 285
 Gly Ala Gly Ser Phe Asp Thr Ser Tyr Ile Leu Thr Leu Thr Pro Leu
 290 295 300

890004ENUK_SeqList.txt

Gly Lys Pro Gly Asn Tyr Thr Asp Asn Lys Leu Met Asn Glu Cys Ile
 305 310 315 320
 Leu Asp Gln Phe Thr Leu Asp Glu Lys Tyr Arg Pro Thr Pro Thr Ser
 325 330 335
 Ile Ser Thr Ala Ala Glu Glu Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ser Asp
 340 345 350
 Gly Asp Ala Pro Ser Thr Thr Lys Pro Ile Phe Arg Glu Glu Thr Ala
 355 360 365
 Ser Pro Thr Pro Asn Ala Val Thr Lys Pro Ser Pro Asp Thr Ser Asp
 370 375 380
 Ser Ser Asp Asp Asp Lys Asp Ser Ala Ala Ser Met Ser Ala Gln Gly
 385 390 395 400
 Leu Thr Gly Thr Val Leu Phe Thr Val Ala Ala Leu Gly Tyr Met Leu
 405 410 415
 Val Ala Phe

<210> 16
 <211> 499
 <212> SIMON
 <213> Bacillus subtilis
 <400> 16

Met Lys Arg Ser Ile Ser Ile Phe Ile Thr Cys Leu Leu Ile Thr Leu
 1 5 10 15
 Leu Thr Met Gly Gly Met Ile Ala Ser Pro Ala Ser Ala Ala Gly Thr
 20 25 30
 Lys Thr Pro Val Ala Lys Asn Gly Gln Leu Ser Ile Lys Gly Thr Gln
 35 40 45
 Leu Val Asn Arg Asp Gly Lys Ala Val Gln Leu Lys Gly Ile Ser Ser
 50 55 60
 His Gly Leu Gln Trp Tyr Gly Glu Tyr Val Asn Lys Asp Ser Leu Lys
 65 70 75 80
 Trp Leu Arg Asp Asp Trp Gly Ile Thr Val Phe Arg Ala Ala Met Tyr
 85 90 95
 Thr Ala Asp Gly Gly Tyr Ile Asp Asn Pro Ser Val Lys Asn Lys Val
 100 105 110

890004EMUK_SeqList.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

890004ENMK_SeqLst.txt

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

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

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

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

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

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

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

Glu Pro Asn

<210> 17
<211> 185
<212> SINOM
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Варіант «сиранази» Bacillus subtilis

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

890004ENUK_SeqLst.txt

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

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

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

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

Ser Gly Ser Ser Asn Val Thr Val Trp
 180 185

- <210> 18
- <211> 185
- <212> EIRON
- <213> Вступна послідовність

- <220>
- <223> Варіант ксиманазы Bacillus subtilis

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

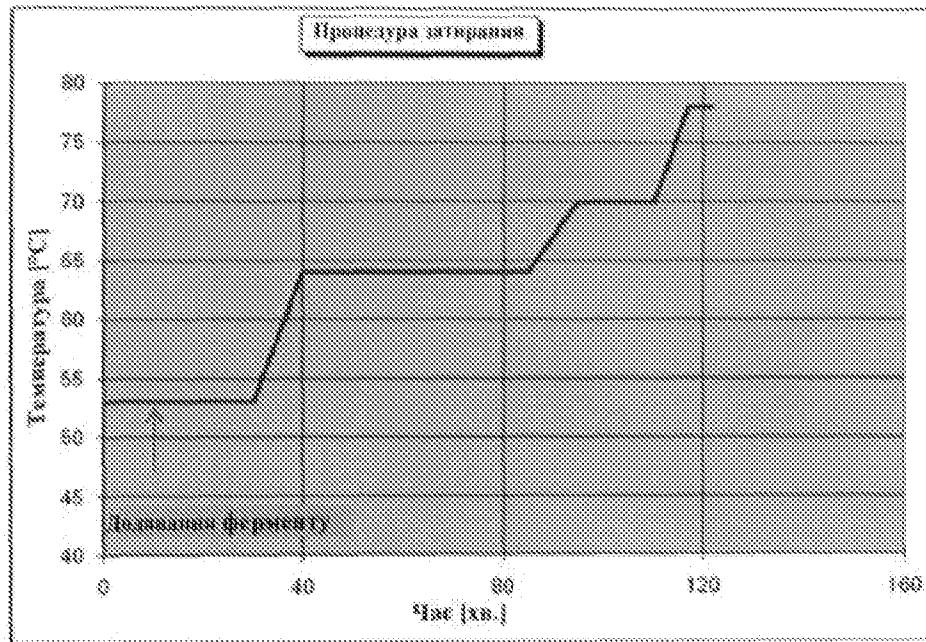
Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Pro Thr Gly Ser Asn Ala Thr Ile
 130 135 140

890004EMUK_SeqLst.txt

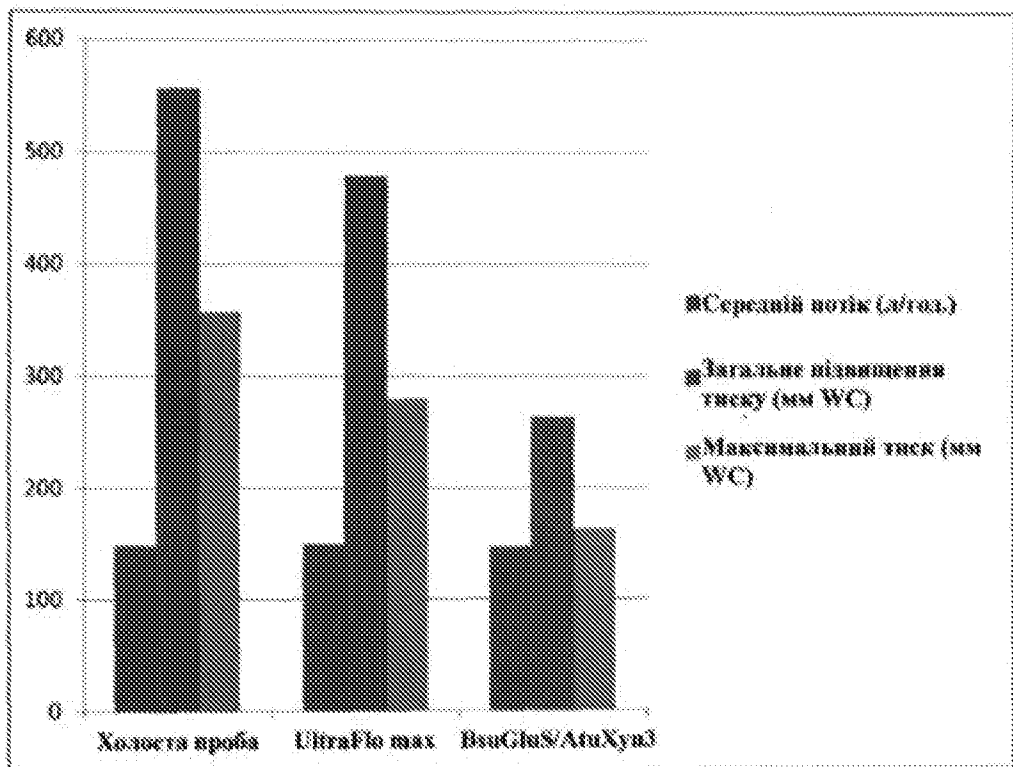
Thr	Phe	Ser	Asn	His	Val	Asn	Ala	Trp	Arg	Ser	His	Gly	Met	Asp	Leu
145					150					155					160
Gly	Ser	Asn	Trp	Ala	Tyr	Gln	Val	Met	Ala	Thr	Glu	Gly	Tyr	Leu	Ser
				165					170					175	
Ser	Gly	Ser	Ser	Asn	Val	Thr	Val	Trp							
			180					185							

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

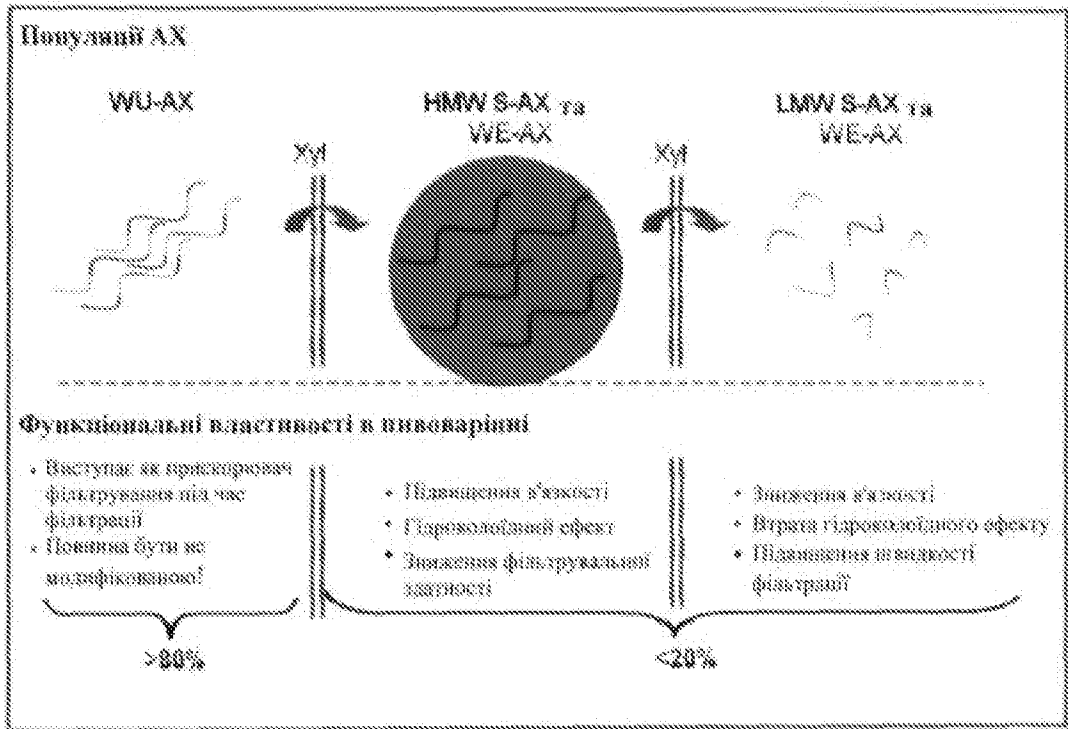
- 5 1. Ферментна композиція, що включає фермент, що характеризується ендо-1,4-β-ксилазнаною активністю, що містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 90 % ідентичність SEQ ID NO: 1; в комбінації з ферментом, що характеризується ендо-1,3(4)-β-глюканазною активністю, що має щонайменше 90 % ідентичність SEQ ID NO: 7.
- 10 2. Композиція за п. 1, де вказані ферменти мають щонайменше 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99 % ідентичність з амінокислотною послідовністю, вибраною з SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 7.
3. Крохмальвмісний матеріал, що містить ферментну композицію за будь-яким з пп. 1 або 2.
4. Крохмальвмісний матеріал за п. 3, що використовується для одержання продукту для харчування людини, корму для тварини або солодового напою, заготовок із тіста або випечених продуктів, пульпи або паперу, злакових компонентів, де злак являє собою жито, пшеницю або ячмінь, пива або модифікації побічних продуктів з процесу пивоваріння, вина або соку,
- 15 біопалива першого або другого покоління, такого як біоетанол.
5. Спосіб зміни фільтрувальності крохмальвмісного матеріалу, причому зазначений спосіб включає стадію обробки зазначеного крохмальвмісного матеріалу композицією за будь-яким з пп. 1 або 2.
- 20 6. Спосіб зменшення підвищення тиску під час фільтрування пивного сусла у пивоварінні, причому зазначений спосіб включає стадію обробки пивного сусла композицією за будь-яким з пп. 1 або 2.
7. Спосіб одержання харчового продукту, де зазначений спосіб включає стадію обробки крохмальвмісного матеріалу композицією за будь-яким з пп. 1 або 2.
- 25 8. Спосіб за п. 7, де харчовий продукт являє собою продукт для харчування людини, корм для тварини, напій, такий як спиртовий або безалкогольний напій, напій на основі злаку або на основі солоду, такий як пиво або віскі.
9. Спосіб одержання пивного сусла, причому зазначений спосіб включає стадію обробки крохмальвмісного матеріалу композицією за будь-яким з пп. 1 або 2.
- 30 10. Спосіб одержання біопалива першого або другого покоління, такого як біоетанол, причому зазначений спосіб включає стадію обробки крохмальвмісного матеріалу композицією за будь-яким з пп. 1 або 2.



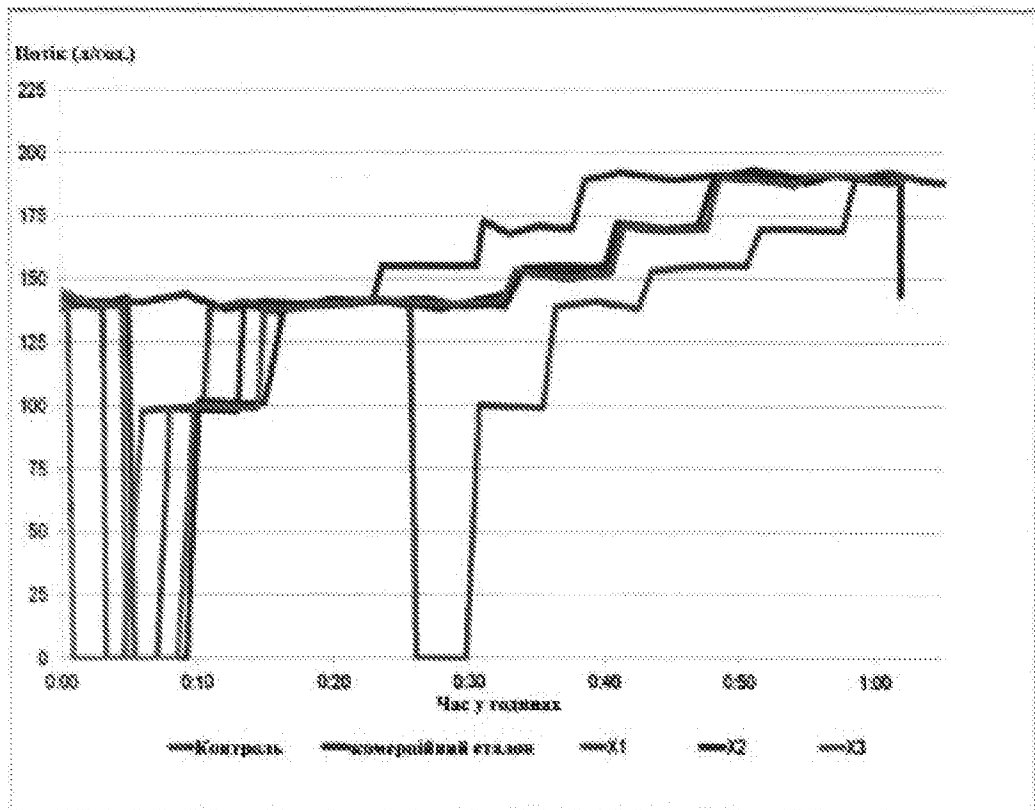
Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



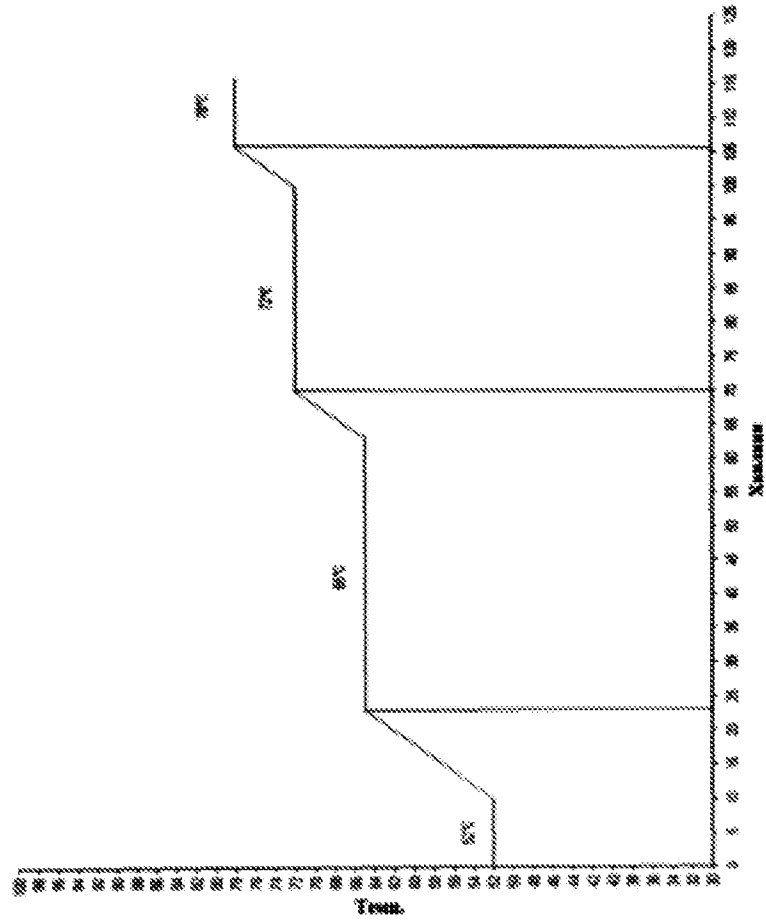
Фіг. 4



Фіг. 5



Фіг. 6



Фіг. 7