

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6084617号
(P6084617)

(45) 発行日 平成29年2月22日 (2017. 2. 22)

(24) 登録日 平成29年2月3日 (2017. 2. 3)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/42 (2006. 01)

C 1 2 N 9/42

C 1 2 N 9/24 (2006. 01)

C 1 2 N 9/24

C 1 2 P 7/06 (2006. 01)

C 1 2 P 7/06

C 1 2 C 7/00 (2006. 01)

C 1 2 C 7/00

請求項の数 14 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-530234 (P2014-530234)
 (86) (22) 出願日 平成24年9月14日 (2012. 9. 14)
 (65) 公表番号 特表2014-527813 (P2014-527813A)
 (43) 公表日 平成26年10月23日 (2014. 10. 23)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/068041
 (87) 国際公開番号 W02013/037933
 (87) 国際公開日 平成25年3月21日 (2013. 3. 21)
 審査請求日 平成27年9月9日 (2015. 9. 9)
 (31) 優先権主張番号 11181241.8
 (32) 優先日 平成23年9月14日 (2011. 9. 14)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 61/534, 574
 (32) 優先日 平成23年9月14日 (2011. 9. 14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 397060588
 デュポン ニュートリション バイオサイ
 エンシーズ エービーエス
 デンマーク国 ディーケー 1 4 1 1 コ
 ペンハーゲン ランゲブログård 1
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸
 (72) 発明者 イェンス・フリズベク・ソレンセン
 デンマーク国 DK-8200. オーフス
 エヌ. ノルドヴェストパッサーゲン93
 (72) 発明者 ロネ・ブロンド・ミラー
 デンマーク国 DK-8260ヴィビー ジ
 ェイ. ボローソンスフェイ20
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エンドー 1, 4-β-キシラナーゼ活性を示す酵素であって、配列番号 1 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含む酵素、またはその任意の機能性断片を、エンドー 1, 3 (4)-β-グルカナーゼ活性を示す酵素であって、配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含む酵素、またはその任意の機能性断片と組み合わせて含む組成物。

【請求項 2】

前記エンドー 1, 4-β-キシラナーゼ活性を示す酵素が、配列番号 1 のアミノ酸配列と少なくとも 91、92、93、94、95、96、97、98 または 99% の同一性を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

請求項 1 もしくは 2 に記載の組成物の、食料、飼料もしくは麦芽飲料製品の製造、生地もしくは焼き製品の製造、パルプもしくは紙の調製、穀類成分の調製、ビールの製造もしくは醸造プロセスからの副産物の改変、ワインもしくはジュースの製造、または第 1 もしくは第 2 世代バイオ燃料の製造、における使用。

【請求項 4】

穀類がライ麦、小麦もしくは大麦である、請求項 3 に記載の使用。

【請求項 5】

バイオ燃料がバイオエタノールである、請求項 3 に記載の使用。

【請求項 6】

デンプンを含む材料のろ過性を変更する方法であって、請求項 1 もしくは 2 に記載の組成物により前記デンプンを含む材料を処理するステップを含む、上記方法。

【請求項 7】

醸造用途においてロータリングの間に増大される圧力を低減する方法であって、請求項 1 もしくは 2 に記載の組成物で醸造マッシュを処理するステップを含む、上記方法。

【請求項 8】

食料、飼料、または飲料製品の製造のための方法であって、請求項 1 もしくは 2 に記載の組成物によりデンプンを含む材料を処理するステップを含む、上記方法。

【請求項 9】

飲料がアルコールまたはノンアルコール飲料である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

飲料が穀類または麦芽ベースの飲料である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

飲料がビールまたはウイスキーである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

醸造マッシュの製造のための方法であって、請求項 1 もしくは 2 に記載の組成物によりデンプンを含む材料を処理するステップを含む、上記方法。

【請求項 13】

第 1 または第 2 世代バイオ燃料の製造のための方法であって、請求項 1 もしくは 2 に記載の組成物によりデンプンを含む材料を処理するステップを含む、上記方法。

【請求項 14】

バイオ燃料がバイオエタノールである、請求項 13 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、食料、飲料（例えば、ビール）、飼料、またはバイオ燃料の製造、例えば醸造プロセスなどで使用するのに適した改善された特性を有する酵素およびこれらの酵素を含む組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

ビールの製造における酵素の使用はよく知られている。マッシュのろ過性を改善させ、抽出物の収量を増大するために酵素をマッシング工程へ適用することは、特許文献 1 に記載されている。

【0003】

特許文献 2 および 3 は、ビールの製造プロセスにおけるマッシングおよびろ過工程と、このようなプロセスで使用するための酵素組成物とに関する。

【0004】

特許文献 4 は、ペニシリウム・フニクロスム（*Penicillium funiculosum*）株と、それから得られる新しい酵素混合物と、それに対する核配列（*nucleic sequence*）とに関する。

【0005】

しかしながら、食料および飲料製品の製造、例えばビールまたはウイスキーなどのアルコール飲料の製造におけるマッシング、調理およびろ過工程などで有用である改善された酵素および酵素の組み合わせが必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献 1】 国際公開第 97/42302 号パンフレット

【特許文献 2】 国際公開第 2005118769 号パンフレット

10

20

30

40

50

【特許文献3】国際公開第2005059084号パンフレット

【特許文献4】国際公開第1999057325号パンフレット

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の実施形態の目的は、食料および飲料製品の製造、例えばアルコールまたはノンアルコール飲料、例えばビールまたはウイスキーのような穀類または麦芽ベースの飲料などの製造に適した酵素を提供することである。提供される酵素は、醸造における使用に関して改善された特性を有することができる。これらの広範な種類の改善された特性には、例えば、改善された温度最適条件、可溶性（WE-A X）アラビノキシラン基質における活性の、不溶性（WU-A X）アラビノキシラン基質における活性に対する改善された比率、醸造プロセスのロータリングおよび／またはろ過工程の間に増大される全圧の低減、ならびに酵素処理された材料の増大されたる過性が含まれる。

10

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らによって、1つまたは複数の酵素および酵素の特定の組み合わせは、特に、デンプン含有材料が1つまたは複数の酵素で処理されて醸造マッシュが生じる醸造プロセスでの使用に関して、既知の酵素および酵素の組み合わせに対して改善された特性を有することが見出された。

【0009】

20

従って、第1の態様では、本発明はエンドー1，4-β-キシラナーゼ活性を示す酵素に関し、本酵素は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号17、および配列番号18から選択されるいずれか1つ、またはその任意の機能性断片と少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0010】

本明細書で使用される場合、「機能性断片」は、切断されていない基準酵素と本質的に同じであるかまたは少なくともかなりの程度の酵素活性を有する酵素の切断型を指す。

【0011】

第2の態様では、本発明は、エンドー1，3（4）-β-グルカナーゼ活性を示す酵素に関し、本酵素は、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、および配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16から選択されるいずれか1つ、またはその任意の機能性断片と少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

【0012】

第3の態様では、本発明は、本発明に従う酵素をコードするDNA配列を含むDNA構築物に関する。

【0013】

さらなる態様では、本発明は、本発明に従う酵素をコードするDNA配列を含むDNA構築物を含む組換え発現ベクターに関する。

【0014】

40

さらなる態様では、本発明は、本発明に従う酵素をコードするDNA配列を含むDNA構築物で形質転換された細胞に関する。

【0015】

さらなる態様では、本発明は、本発明に従う酵素、またはDNA構築物、またはベクター、または細胞を含む調製物に関する。

【0016】

さらなる態様では、本発明は、いずれか1つまたは複数のβ-グルカナーゼと組み合わせて、本発明に従うエンドー1，4-β-キシラナーゼ活性を示す酵素を含む組成物に関する。

【0017】

50

さらなる態様では、本発明は、いずれか1つまたは複数のキシラナーゼと組み合わせて、本発明に従うエンドー1, 3(4)- β -グルカナーゼ活性を示す酵素を含む組成物に関する。

【0018】

さらなる態様では、本発明は、本発明に従う酵素、または本発明に従う調製物、または本発明に従う組成物の、食料、飼料、または麦芽飲料製品、例えばビールまたはウイスキーなどの製造における使用に関する。

【0019】

さらなる態様では、本発明は、本発明に従う酵素、または本発明に従う調製物、または本発明に従う組成物の、生地(dough)または焼き製品の製造における使用に関する。

10

【0020】

さらなる態様では、本発明は、本発明に従う酵素、または本発明に従う調製物、または本発明に従う組成物の、パルプまたは紙の調製における使用に関する。

【0021】

さらなる態様では、本発明は、本発明に従う酵素、または本発明に従う調製物、または本発明に従う組成物の、穀類成分の調製のための使用に関する。いくつかの実施形態では、穀類はライ麦、小麦、または大麦である。

【0022】

さらなる態様では、本発明は、本発明に従う酵素、または本発明に従う調製物、または本発明に従う組成物の、ビールの製造または醸造プロセスからの副産物の改変における使用に関する。

20

【0023】

さらなる態様では、本発明は、本発明に従う酵素、または本発明に従う調製物、または本発明に従う組成物の、ワインまたはジュースの製造における使用に関する。

【0024】

さらなる態様では、本発明は、本発明に従う酵素、または本発明に従う調製物、または本発明に従う組成物の、バイオエタノールなどの第1または第2世代バイオ燃料の製造における使用に関する。

【0025】

さらなる態様では、本発明は、デンプンを含む材料のろ過性を変更する方法に関し、前記方法は、本発明に従う酵素、または調製物、または組成物により前記デンプンを含む材料を処理するステップを含む。

30

【0026】

さらなる態様では、本発明は、醸造用途においてロータリングの間に増大される圧力を低減する方法に関し、前記方法は、本発明に従う酵素、または調製物、または組成物で醸造マッシュを処理するステップを含む。

【0027】

さらなる態様では、本発明は、食料、飼料、または飲料製品、例えばアルコールまたはノンアルコール飲料、例えばビールまたはウイスキーのような穀類または麦芽ベースの飲料の製造のための方法に関し、前記方法は、本発明に従う酵素、または調製物、または組成物によりデンプンを含む材料を処理するステップを含む。

40

【0028】

さらなる態様では、本発明は、醸造マッシュの製造のための方法に関し、前記方法は、発明に従う酵素、または調製物、または組成物によりデンプンを含む材料を処理するステップを含む。

【0029】

さらなる態様では、本発明は、バイオエタノールなどの第1または第2世代バイオ燃料の製造のための方法に関し、前記方法は、本発明に従う酵素、または調製物、または組成物によりデンプンを含む材料を処理するステップを含む。

50

【0030】

さらなる態様では、本発明は、本発明に従う方法によって得られる製品に関する。

【0031】

さらなる態様では、本発明は、本発明に従う方法によって得られる製品を含み、例えば、本製品が0.1%~99.9%の範囲であるような組成物に関する。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】実験室スケールおよびパイロットスケールの醸造で使用するマッシングプロフィール。10分のマッシングイン(mashing-in)時間の後に酵素を添加することによって、マッシングを開始した。

10

【図2】グルカナーゼおよびキシラナーゼのスクリーニングの検証からの、パイロットスケールの醸造用途の結果である。A. tubキシラナーゼと組み合わせたB. subグルカナーゼSを、ブランクおよびUltraFlo maxに対して試験した。収集されたデータは、平均流量(L/h)、ロータリングを通して増大される全圧(mmWC、ここで、1mmWC=9.80665Paである)、およびロータリング間に記録される最大圧力(mmWC)であった。

【図3】醸造におけるキシラナーゼの機能性。

【図4】流量一種々のキシラナーゼ候補を適用するロータリング。

【図5】ビールのろ過—繰り返したろ過の平均。

【図6】ビールのろ過—繰り返したろ過の平均。

20

【図7】実施例3のマッシング図。

【発明を実施するための形態】

【0033】

ビールは、伝統的に、麦芽(例えば、大麦粒から得られる麦芽など)および場合により添加物(例えば、デンプン含有材料(例えば、穀類粒)など)から得られ、そして場合により、例えばホップによって風味が付けられたアルコール飲料であるといわれる。

【0034】

本発明との関連では、「ビール」という用語は、デンプン含有植物材料の発酵/醸造によって生じるあらゆる発酵麦汁を含み、従って特に、添加物、または麦芽および添加物の任意の組み合わせから排他的に生じるビールも含むことを意味する。

30

【0035】

「発酵」という用語は、本発明との関連では、培養液中で微生物を増殖させることによる、エタノールなどの物質の製造を意味する。一般に、発酵のために酵母などの微生物が使用される。

【0036】

本明細書で使用される場合、「麦芽」という用語は任意の穀類粒麦芽、例えば大麦麦芽などであると理解される。「添加物」は麦芽または大麦麦芽ではない任意のデンプン含有植物材料であると定義することができる。

【0037】

「デンプン含有植物材料」は、例えば、大麦、小麦、トウモロコシ、ライ麦、ソルガム、キビ、または米、およびこれらの任意の組み合わせなどの1つまたは複数の穀類であり得る。デンプン含有植物材料は、加工、例えば、製粉、麦芽化、特に麦芽化することもできるし、あるいは麦芽化しなくてもよい。麦芽化されない穀類は「未加工穀物」とも呼ばれる。穀類でないデンプン含有植物材料の例には、例えば、ジャガイモおよびキャッサバなどの塊茎が含まれる。

40

【0038】

本明細書で使用される場合、「飲料」および「飲料製品」という用語は、全麦芽ビール、「ビール純粋令(Reinheit sgebot)」の下で醸造されたビール、エール、ドライビール、ニアビール、ライトビール、ローアルコールビール、低カロリービール、ポーター、ボックビール、スタウト、モルトリカー、ノンアルコールビール、ノンアル

50

コールモルトリカーなどの発泡性発酵飲料を含む。「飲料」または「飲料製品」という用語は、果実風味の麦芽飲料、例えば、シトラス風味（例えば、レモン、オレンジ、ライムなど）、もしくはベリー風味の麦芽飲料、リカー風味の麦芽飲料、例えば、ウォッカ、ラム、もしくはテキーラ風味のモルトリカー、またはコーヒー風味の麦芽飲料（例えば、カフェイン風味のモルトリカーなど）などの非発泡性ビールおよび代替麦芽飲料も含む。

【0039】

ビールは、様々なデンプン含有植物材料から本質的に同一のプロセスによって製造することができ、ここで、デンプンは主にグルコースホモポリマーからなり、グルコース残基はアルファー1, 4-結合またはアルファー1, 6-結合のいずれかによって連結されており、前者の方が主である。

10

【0040】

ビールなどの発酵飲料の製造プロセスは通常醸造と呼ばれる。これらの飲料の製造で使用する典型的な原材料は、水、ホップおよび麦芽である。麦芽に加えて、あるいは麦芽の代わりに、一般的なひき割りトウモロコシ、精製ひき割りトウモロコシ、醸造用粉碎酵母、米、ソルガム、精製コーンスターチ、大麦、大麦デンプン、脱穀大麦、小麦、小麦デンプン、焙焼 (t o r r i f i e d) 穀類、穀類フレーク、ライ麦、オーツ麦、ジャガイモ、タピオカ、およびシロップ（例えば、コーンシロップ、サトウキビシロップ、転化糖シロップ、大麦および／または小麦シロップなど）などの添加物がデンプン源として使用されてもよい。デンプンは、最終的に、酵素により発酵性糖に転化されるであろう。

【0041】

20

主に麦芽から製造されるビール（例えば、15～20%までの添加物）に関して、いくつかの理由で、選択される種々の大麦から主に製造される麦芽は、ビールの全体の特徴および品質に最も大きな影響を与える。第1に、麦芽はビールの主要な風味剤である。第2に、麦芽は発酵性糖の大部分を提供する。第3に、麦芽はタンパク質を提供し、これは、ビールのこくおよび泡の特徴に寄与し得る。第4に、麦芽はマッシングの間に必要な酵素活性を提供する。

【0042】

ホップも、風味を含むビール品質に著しく寄与する。特に、ホップ（またはホップ構成物質）はビールに望ましい苦味物質を添加する。さらに、ホップはタンパク質沈殿剤の機能を果たし、防腐剤を確立し、泡の形成および安定化に役立つ。全てのビールがホップを用いて製造されるわけではない。プロテアーゼ（例えば、パパイン）などの他の安定剤も使用され得る。

30

【0043】

本発明に対する限定であると解釈されることは望まないが、従来の醸造プロセスは以下のように説明することができる。

【0044】

ビールの製造プロセスは当該技術分野においてよく知られているが、簡単に言うと、5つの工程：（a）マッシングおよび／または添加物調理と、（b）麦汁分離および抽出と、（c）麦汁の沸騰およびホッピングと、（d）冷却、発酵および貯蔵と、（e）熟成、加工および梱包とが含まれる。通常、第1の工程では、製粉または破碎された麦芽は水と混合され、制御された温度下で一定期間保持され、麦芽中に存在する酵素によって、麦芽中に存在するデンプンを発酵性糖に転化させる。

40

【0045】

第2の工程では、マッシュは「ロータータン (l a u t e r t u n)」またはマッシュフィルタに移され、そこで穀物残渣から液体が分離される。この甘い液体は「麦汁」と呼ばれ、残された穀物残渣は「使用済み穀物」と呼ばれる。使用済み穀物から残りの可溶性抽出物を回収するために、通常マッシュは、水をマッシュに添加することを含む抽出を受ける。

【0046】

第3の工程では、麦汁は激しく沸騰される。これにより麦汁は殺菌され、色、風味およ

50

び香りの発生が助けられる。ホップは沸騰中のある時点で添加される。

【0047】

第4の工程では、麦汁は冷却され、酵母を含有するかあるいは酵母が添加される発酵槽に移される。酵母は発酵により糖をアルコールおよび二酸化炭素ガスに転化させ、発酵の最後に、発酵を停止させるために発酵槽は冷却される、あるいは発酵槽は冷却され得る。酵母は凝結し、そして除去される。

【0048】

最後の工程では、ビールは冷却されて一定期間貯蔵され、その間にビールは透明になり、その風味が発生し、ビールの外観、風味および貯蔵期間を損なう可能性のあるあらゆる材料が沈降する。梱包の前に、ビールは炭酸ガスで飽和され、場合によりろ過および低温殺菌される。

10

【0049】

発酵の後、通常約2重量%～約10重量%のアルコールを含有する飲料が得られる。非発酵性炭水化物は発酵中に転化されず、最終ビール中に溶解された固形分の大部分を形成する。

【0050】

麦芽アミラーゼはデンプンのアルファ-1, 6-結合を加水分解することができないので、この残渣が残る。非発酵性炭水化物は、ビール12オンス当たり約50カロリーを与える。

【0051】

20

近年、特に米国市場において、ライトビール、カロリーが低下されたビールまたは低カロリービールと呼ばれる醸造飲料が広く普及してきた。米国において定義されるように、これらのビールは、製造業者の「普通の」ビールよりもカロリーが約30%少ない。

【0052】

従来の醸造プロセスについてのさらなる情報、および本発明に適用される醸造技術の分野で使用される用語についての定義は、the Research and Teaching Institute of Brewing, Berlin (VLB) の Wolfgang Kunze による「Technology Brewing and Malting」第2改訂版1999, ISBN 3-921690-39-0, 第3版(2004): ISBN 3-921690-49-8, 第4最新版, 2010 (ISBN 978-3-921690-64-2) において見出すことができる。

30

【0053】

キシラナーゼは、EC 3. 2. 1. 8、EC 3. 2. 1. 32、EC 3. 2. 1. 136 および EC 3. 2. 1. 156 に分類され、これらの活性は、例えば、実施例に記載されるように測定することができる。本発明に従うエンド-1, 3(4)-β-グルカナーゼ活性を示す酵素と組み合わせて使用すべき適切なキシラナーゼには、国際公開第2010072226号パンフレット、国際公開第2010072225号パンフレット、国際公開第2010072224号パンフレット、国際公開第2005059084号パンフレット、国際公開第2007056321号パンフレット、国際公開第2008023060A号パンフレット、国際公開第9421785号パンフレット、国際公開第2006114095号パンフレット、国際公開第2006066582号パンフレット、米国特許出願公開第2008233175号明細書、および国際公開第10059424号パンフレットに開示されるいずれか1つのキシラナーゼなど、EC 3. 2. 1. 8、EC 3. 2. 1. 32、EC 3. 2. 1. 136 および EC 3. 2. 1. 156 に分類されるあらゆるキシラナーゼが含まれる。

40

【0054】

エンド-1, 4-ベータキシラナーゼはEC 3. 2. 1. 8 に分類される。酵素は、キシランの1, 4-ベータ-D-キシロシド (xylosidic) 結合のエンド加水分解 (endohydrolysis) を引き起こす。

【0055】

50

「ファミリー11キシラナーゼ」、「グリコシドヒドロラーゼ (GH) ファミリー11」または単に「GH11キシラナーゼ」という用語は、本明細書で使用される場合、EC 3. 2. 1. 8 に分類されるエンド-1, 4-ベータキシラナーゼを指し、これは、キシランの1, 4-ベーター-D-キシロシド結合のエンド加水分解を引き起こし、B. Henrissat, A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 280 (1991), pp. 309-316 に従ってファミリー11キシラナーゼに分類される。

【0056】

「ファミリー10キシラナーゼ」、「グリコシドヒドロラーゼ (GH) ファミリー10」または単に「GH10キシラナーゼ」という用語は、キシラナーゼ (EC: 3. 2. 1. 8)、エンド-1, 3-ベーターキシラナーゼ (EC: 3. 2. 1. 32)、セロビオヒドロラーゼ (EC: 3. 2. 1. 91) などのいくつかの既知の活性を有する酵素を含む。これらの酵素は、以前は、セルラーゼファミリーFとして知られていた。

【0057】

いくつかの実施形態では、エンド-1, 4-β-キシラナーゼ活性を示す酵素は、ファミリー11キシラナーゼである。いくつかの実施形態では、エンド-1, 4-β-キシラナーゼ活性を示す酵素はファミリー10キシラナーゼである。

【0058】

1つの態様では、本発明に従う酵素組成物は、実施例において記載されるアッセイによって測定されるエンド-1, 4-ベータキシラナーゼ活性を有する。

【0059】

キシラナーゼ活性を測定するためのアッセイは、基質としてキシランを用いて、pH 3. 5 または pH 5 および 50 °C で実行されてもよいし、あるいは、酵素の付加的特徴付けおよび特定化のために異なる pH および温度値で実施することもできる。酵素活性は、540 nm においてキシロースによって生じる単位時間当たりの吸光度の増大から計算される。

【0060】

いくつかの実施形態では、本発明に従う酵素組成物は、実施例において記載されるアッセイによって測定される場合に、少なくとも約 5000 U/g、例えば少なくとも約 6000 U/g、例えば少なくとも約 7000 U/g、例えば少なくとも約 8000 U/g、例えば少なくとも約 8500 U/g などのキシラナーゼ活性を含む。

【0061】

本発明に従う酵素組成物はセルロース分解活性を有する。セルロースの系統名は4-(1, 3; 1, 4)-β-D-グルカン4-グルカノヒドロラーゼであり、セルロース分解酵素またはセルラーゼはEC 3. 2. 1. 4 に分類される。セルラーゼは、例えば、セルロース、リケニンおよび穀類のβ-D-グルカンの(1→4)-β-D-グルコシド結合をエンド加水分解し、1, 3-結合も含有するβ-D-グルカンの1, 4-結合も加水分解し得る。またセルラーゼは、エンド-1, 4-β-D-グルカナーゼ、β-1, 4-グルカナーゼ、β-1, 4-エンドグルカンヒドロラーゼ、セルラーゼA、セルロシンAP、エンドグルカナーゼD、アルカリセルロース、セルラーゼA3、セルデキストリナーゼ、9. 5セルラーゼ、アビセルラーゼ、パンセルラーゼSSおよび1, 4-(1, 3; 1, 4)-β-D-グルカン4-グルカノヒドロラーゼなどの他の名称も有する。

【0062】

本発明の1つの態様では、本発明に従う酵素組成物のセルラーゼ活性は、「アッセイ」という表題の下で以下に記載されるような「セルラーゼ活性方法」によって測定される。

【0063】

さらなる態様では、本発明は、実施例において記載されるアッセイによって決定されるエンド-1, 3(4)-β-グルカナーゼ活性を有する酵素に関する。

【0064】

10

20

30

40

50

「 β -グルカナーゼ」または「ベーターグルカナーゼ」は、本明細書で使用される場合、E C 3. 2. 1. 6のエンドー1, 3 (4)-ベーターグルカナーゼを指す。加水分解すべき結合中にその還元性基が含まれるグルコース残基がそれ自体C-3で置換されている場合に、ベーターD-グルカンの(1 $\rightarrow$ 3)-または(1 $\rightarrow$ 4)-結合のエンド加水分解を触媒する。本発明に従うエンドー1, 4- β -キシラナーゼ活性を示す酵素と組み合わせて使用すべき適切なベーターグルカナーゼには、国際公開第2004087889号パンフレット、国際公開第2005059084号パンフレット、国際公開第9414953号パンフレット、国際公開第2007056321号パンフレット、国際公開第9531533号パンフレット、国際公開第08023060号パンフレット、国際公開第2005100582号パンフレット、国際公開第9828410号パンフレット、国際公開第9742301号パンフレット、国際公開第2006066582号パンフレット、国際公開第05118769号パンフレット、国際公開第2005003319号パンフレット、および国際公開第10059424号パンフレットにおいて開示されるいずれか1つのベーターグルカナーゼが含まれる。

10

【0065】

標準アッセイはpH 5. 0で実行され、酵素の付加的な特徴付けおよび特定化のために、異なるpH値で実施されることが可能である。

【0066】

エンドー1, 3 (4)- β -グルカナーゼ活性の1つの単位は、アッセイの条件 (pH 5. 0 (または指定される通り) および50℃) 下で1分につき1 μ molのグルコース当量を生じる酵素の量として定義される。

20

【0067】

いくつかの実施形態では、本発明に従う酵素組成物は、実施例において記載されるアッセイによって測定される場合に、少なくとも約10000 U/g、例えば少なくとも約12000 U/g、例えば少なくとも約14000 U/g、例えば少なくとも約15000 U/g、例えば少なくとも約18000 U/gなどの β -グルカナーゼ活性を含む。

【0068】

さらなる態様では、本発明に従う酵素組成物はラミナリナーゼ活性を有するか、あるいはラミナリナーゼ活性を有するいずれか1つまたは複数のさらなる酵素を含む。ラミナリナーゼ活性は、アッセイのセクションで記載されるラミナラーゼ (laminarase) アッセイに記載されるように決定される。

30

【0069】

ラミナリナーゼは、E. C. 3. 2. 1. 6に分類されるエンドー1, 3 (4)-ベーターグルカナーゼまたはE. C. 3. 2. 1. 39に分類されるグルカンエンドー1, 3-ベーターD-グルコシダーゼであり得る。ラミナリナーゼ、エンドー1, 3-ベーターグルカナーゼ、エンドー1, 4-ベーターグルカナーゼという代替名を有するエンドー1, 3 (4)-ベーターグルカナーゼは、E. C. 3. 2. 1. 6に分類される。基質には、ラミナリン、リケニンおよび穀類D-グルカンが含まれ、加水分解すべき結合中にその還元性基が含まれるグルコース残基がそれ自体C-3で置換されている場合に、酵素はベーターD-グルカンの(1 $\rightarrow$ 3)-または(1 $\rightarrow$ 4)-結合のエンド加水分解を触媒する。(1 $\rightarrow$ 3)-ベーターグルカンエンドヒドロラーゼ、エンドー1, 3-ベーターグルカナーゼおよびラミナリナーゼという代替名を有するグルカンエンドー1, 3-ベーターD-グルコシダーゼはE. C. 3. 2. 1. 39に分類され、例えばラミナリン、パラミロンおよびパキマンのような基質の(1 $\rightarrow$ 3)-ベーターD-グルカンの(1 $\rightarrow$ 3)-ベーターD-グルコシド結合を加水分解する。

40

【0070】

いくつかの態様では、本発明に従う酵素組成物はアラビナナーゼ活性を有するか、あるいはアラビナナーゼ活性を有するさらなる酵素を含む。アラビナナーゼはE C 3. 2. 1. 99に分類される。系統名は5- α -L-アラビナン5- α -L-アラビノヒドロラーゼであるが、アラビナンエンドー1, 5- α -L-アラビノシダーゼ、およびエンドー

50

1, 5- α -L-アラビナーゼ、エンド- α -1, 5-アラビナーゼ、エンド-アラビナーゼ、1, 5- α -L-アラビナンおよび1, 5- α -L-アラビノヒドロラーゼなどのいくつかの他の名前を有する。アラビナーゼは、(1 $\rightarrow$ 5)-アラビナンの(1 $\rightarrow$ 5)- α -アラビノフラノシド結合をエンド加水分解する。アラビナーゼはアラビナンにも作用する。

【0071】

本発明の1つの態様では、本発明に従う酵素組成物のアラビナーゼ活性は、「アッセイ」という表題の下で以下に記載されるようなアラビナーゼアッセイによって測定される。アッセイは基質として砂糖大根アラビナンを用いてpH 3.5および50℃で実行することができ、酵素の付加的な特徴付けおよび特定化のために異なるpHおよび温度値で実施

10

【0072】

アラビナーゼ活性の1つの単位は、アッセイの条件(pH 3.5および50℃)下で $\Delta OD_{540nm} \cdot min^{-1}$ の増大を与える酵素の量(全アッセイ容積に対して基準化)として定義される。

【0073】

いくつかの態様では、本発明に従う酵素組成物はベーターD-グルコシドグルコヒドロラーゼ活性を有するか、あるいはベーターD-グルコシドグルコヒドロラーゼ活性を有するさらなる酵素を含む。ベーターD-グルコシドグルコヒドロラーゼは、E.C 3.2.1.21の酵素を指す。

20

【0074】

いくつかの態様では、本発明に従う酵素組成物は β -キシロシダーゼ活性を有するか、あるいは β -キシロシダーゼ活性を有するさらなる酵素を含む。「 β -キシロシダーゼ」または「キシラン1, 4-ベーターキシロシダーゼ」は、E.C 3.2.1.37の酵素を指す。 β -キシロシダーゼは(1 $\rightarrow$ 4)-ベーターD-キシランの加水分解を触媒し、非還元性末端から連続的なD-キシロース残基を除去する。

【0075】

本発明のいくつかの態様では、本発明に従う酵素組成物はセロビオヒドロラーゼ活性を有するか、あるいはセロビオヒドロラーゼ活性有するさらなる酵素を含む。「セロビオヒドロラーゼ」または「セルロース1, 4-ベーターセロビオシダーゼ」は、E.C 3.2.1.91の酵素を指す。セルロース1, 4-ベーターセロビオシダーゼは、セルロースおよびセロテトラオースの1, 4-ベーターD-グルコシド結合の加水分解を触媒して、鎖の非還元性端部からセロビオースを放出する。

30

【0076】

本発明に従う酵素組成物のセロビオヒドロラーゼ活性は、「アッセイ」という表題の下で以下に記載されるようなセロビオヒドロラーゼアッセイによって測定される。標準アッセイはpH 5.0で実行され、酵素の付加的な特徴付けおよび特定化のために異なるpH値で実施されることが可能である。

【0077】

セロビオヒドロラーゼ活性の1つの単位は、アッセイの条件(pH 5.0(または指定される通り)および50℃)下でp-ニトロフェニル β -D-セロビオピラノシドから1分につき1 μ molのp-ニトロフェノールを生じる酵素の量として定義される。

40

【0078】

いくつかの態様では、本発明に従う酵素組成物は α -N-アラビノフラノシダーゼ活性を有するか、あるいはアラビノフラノシダーゼ活性を有するさらなる酵素を含む。「 α -N-アラビノフラノシダーゼ」または「アルファーN-アラビノフラノシダーゼ」は、E.C 3.2.1.55の酵素を指す。 α -N-アラビノフラノシダーゼは、アルファーL-アラビノシドの末端非還元性アルファーL-アラビノフラノシド残基の加水分解を触媒する。

50

【0079】

本発明の1つの態様では、本発明に従う酵素組成物のアラビノフラノシダーゼ活性は、「アッセイ」という表題の下で以下に記載されるようなアラビノフラノシダーゼアッセイによって測定される。標準アッセイはpH 5.0および50℃で実行することができ、酵素の付加的な特徴付けおよび特定化のために、異なるpHおよび温度の値で実施することができる。

【0080】

α -N-アラビノフラノシダーゼ活性の1つの単位は、アッセイの条件（pH 5.0および50℃（または指定される通り））下でp-ニトロフェニル α -L-アラビノフラノシドから1分につき1 μ molのp-ニトロフェノールを生じる酵素の量として定義される。

10

【0081】

いくつかの態様では、本発明に従う酵素組成物はグルカン1,4-ベータ-グルコシダーゼ活性を有するか、あるいはグルカン1,4-ベータ-グルコシダーゼ活性を有するさらなる酵素を含む。「グルカン1,4-ベータ-グルコシダーゼ」または「グルカン1,4-ベータ-グルコシダーゼ」は、E.C 3.2.1.74の酵素を指す。グルカン1,4-ベータ-グルコシダーゼは、(1 $\rightarrow$ 4)-ベータ-D-グルカンの(1 $\rightarrow$ 4)-結合の加水分解を触媒して、連続的なグルコース単位を除去する。

【0082】

いくつかの態様では、本発明に従う酵素組成物はキシログルカン特異的エキソベータ-1,4-グルカナーゼ活性を有するか、あるいはキシログルカン特異的エキソベータ-1,4-グルカナーゼ活性を有するさらなる酵素を含む。「キシログルカン特異的エキソベータ-1,4-グルカナーゼ」は、E.C 3.2.1.155の酵素を指す。キシログルカン特異的エキソベータ-1,4-グルカナーゼは、キシログルカンの(1 $\rightarrow$ 4)-ベータ-D-グルコシド結合のエキソ加水分解(exohydrolysis)を触媒する。

20

【0083】

先行する(proceeding)態様に従う酵素および酵素組成物は、デンプン加水分解物を含む水溶液の粘度の低減を含むプロセスにおいて使用することができる。

【0084】

酵素および酵素組成物は、デンプン加水分解物を含む水溶液のろ過を含むプロセスにおいて使用することもできる。いくつかの実施形態では、デンプン加水分解物を含む水溶液はビール製造のためのマッシュであり、他の実施形態では、デンプン加水分解物を含む水溶液は食料組成物である。

30

【0085】

あるいは、本発明に従う酵素組成物は、果実ジュース、ワイン、穀物加工、燃料アルコール、第1または第2世代バイオ燃料（例えば、バイオエタノールなど）、および飲料アルコールの製造において使用することができる。

【0086】

いくつかの実施形態では、第1または第2世代バイオ燃料（例えば、バイオエタノールなど）は、サトウキビ、ジャガイモ、トウモロコシ、小麦ソルガムなどの農業供給原料から、あるいはトウモロコシ茎葉、スイッチグラスまたは他の植物材料などのセルロース系材料から製造される。いずれの場合も、発酵性糖は原材料から抽出され、微生物によりアルコールへ発酵され、蒸留されて、輸送燃料として使用され得る。本発明に従う酵素組成物は、このバイオ燃料の製造において使用され得る。原材料からの多糖類の抽出を高めるため、多糖類の発酵性糖への分解を促進するため、そして／あるいは、固形分からの液体の分離、流量特性およびポンプ能力などの加工パラメータを高めるために、酵素複合体が添加されてもよい。

40

【0087】

本発明のプロセスは、任意のグリストのマッシングにおいて適用され得る。本発明によ

50

ると、グリストは、任意の植物および植物の一部（塊茎、根、茎、葉および種子を含む）から得ることができる任意のデンプンおよび／または糖含有植物材料を含み得る。

【0088】

いくつかの実施形態では、グリストは、大麦、小麦、ライ麦、オート麦、トウモロコシ、米、ミロ、キビおよびソルガムからの穀物などの穀物を含み、より好ましくは少なくとも10%、またはより好ましくは少なくとも15%、さらにより好ましくは少なくとも25%、または最も好ましくは少なくとも35%、例えば少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも90%、またはさらに100%（w/w）の麦汁のグリストが穀物に由来する。

【0089】

いくつかの実施形態では、グリストは、大麦麦芽などの穀物麦芽を含む。好ましくは、少なくとも10%、またはより好ましくは少なくとも15%、さらにより好ましくは少なくとも25%、または最も好ましくは少なくとも35%、例えば少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも90%またはさらに100%（w/w）の麦汁のグリストが穀物麦芽に由来する。

【0090】

「マッシュ」という用語は、例えば、破碎大麦麦芽、破碎大麦、および／または他の添加物またはこれらの組み合わせを含み、水と混合された水性デンプンスラリーであり、後で、麦汁および使用済み穀物に分離されると理解される。

【0091】

「マッシュ分離」という用語は、例えばロータリングまたはマッシュろ過などによる、使用済み穀物からの麦汁の分離であると理解される。

【0092】

「ビールろ過」という用語は、例えば精密ろ過または膜処理などにより、ビール中にまだ存在している酵母細胞および他の濁りを生じる材料が除去される分離プロセスであると理解される。

【0093】

例えば、本発明に従って調製される食品成分の形態などの酵素調製物は、使用および／または適用モードおよび／または投与モードに依存して、溶液の形態であっても固体であってもよい。固体形態は乾燥酵素粉末として、あるいは粒状酵素としての何れかであり得る。

【0094】

1つの態様では、本発明は、本発明に従う酵素または酵素組成物、酵素キャリア、ならびに場合により安定剤および／または防腐剤を含む酵素組成物調製物を提供する。

【0095】

本発明のまたさらなる態様では、酵素キャリアは、グリセロールまたは水からなる群から選択される。

【0096】

さらなる態様では、調製物は安定剤を含む。1つの態様では、安定剤は、無機塩、ポリオール、糖およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。1つの態様では、安定剤は塩化カリウムなどの無機塩である。別の態様では、ポリオールはグリセロール、プロピレングリコール、またはソルビトールである。さらに別の態様では、糖は小分子炭水化物、特に、グルコース、フルクトースおよびサッカロースなどのいくつかの甘味のある糖のいずれかである。

【0097】

またさらなる態様では、調製物は防腐剤を含む。1つの態様では、防腐剤は、メチルパラベン、プロピルパラベン、ベンゾアート、ソルバート、もしくは他の食品認可された防腐剤、またはこれらの混合物である。

【0098】

本発明の特定の実施形態

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、エンドー 1, 4- β -キシラナーゼ活性を示す酵素は、場合により、いずれか 1 つまたは複数の本発明に従う β -グルカナーゼと組み合わせられて、醸造用途における粘度の著しい低下を提供し、マッシュおよびビールの改善された分離を容易にする。

【0099】

醸造用途のために所望されるキシラナーゼ特性は、以下の態様のうちの 1 つまたは複数を含むことができる：

a) 酵素基質特異性

WE-AX/WU-AX 比は粘度に影響を与える。いくつかの実施形態では、この比は、約 7.0 未満、例えば約 6.5 未満、例えば約 6.0 未満、例えば約 5.5 未満、例えば約 5.0 未満、例えば約 4.5 未満などである。

b) 酵素基質選択性

酵素が切断する分岐点にどれくらい近いかが機能性に影響を与えられ。

c) 酵素の熱安定性

マッシング中の AX の連続的な可溶化—重要な特徴の熱安定性。従って、いくつかの実施形態では、本発明に従うエンドー 1, 4- β -キシラナーゼ活性を示す酵素は、65~78°C の温度範囲内で熱安定性である。

d) 酵素の pH 最適条件。従って、いくつかの実施形態では、エンドー 1, 4- β -キシラナーゼ活性を示す酵素は、pH 5.4~5.6 の範囲の pH 最適条件を有する。

e) 酵素阻害（例えば、キシラナーゼの既知の重要な因子）。

【0100】

醸造用途における粘度の前記著しい低下は、同一条件および量で使用する既知の酵素または酵素活性の組み合わせを有する対照、例えば Ultraflo（登録商標）Max などと比較したときの、醸造用途における粘度の低下として測定することができる。

【0101】

いくつかの実施形態では、本発明に従うエンドー 1, 4- β -キシラナーゼ活性を示す酵素は、場合により、いずれか 1 つまたは複数の本発明に従う β -グルカナーゼと組み合わせられて、醸造用途におけるマッシュおよびビールの改善された分離を提供する。

【0102】

いくつかの実施形態では、本発明に従うエンドー 1, 4- β -キシラナーゼ活性を示す酵素は、場合により、いずれか 1 つまたは複数の本発明に従う β -グルカナーゼと組み合わせられて、異臭形成（アラビノキシランの分解に関連する異臭形成など）の低い可能性を提供する。

【0103】

いくつかの実施形態では、本発明に従うエンドー 1, 4- β -キシラナーゼ活性を示す酵素は、場合により、いずれか 1 つまたは複数の本発明に従う β -グルカナーゼと組み合わせられて、ロータリングなどにおけるろ床（filter bed）崩壊の危険性の低下を提供する。

【0104】

いくつかの実施形態では、本発明に従うエンドー 1, 4- β -キシラナーゼ活性を示す酵素は、場合により、いずれか 1 つまたは複数の本発明に従う β -グルカナーゼと組み合わせられて、異臭の可能性の低減および／または異臭形成の低減を提供する。本発明の 1 つの態様は、エンドー 1, 4- β -キシラナーゼ活性を示す酵素に関し、本酵素は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 17、および配列番号 18 から選択されるいずれか 1 つ、またはその任意の機能性断片と少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0105】

別の態様は、エンドー 1, 3(4)- β -グルカナーゼ活性を示す酵素に関し、本酵素は、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、および配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16 から選択されるい

れか1つ、またはその任意の機能性断片と少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0106】

本発明のいくつかの実施形態では、エンドー1, 4-β-キシラナーゼ活性を示す酵素は、約7.0未満、例えば約6.5未満、例えば約6.0未満、例えば約5.5未満、例えば約5.0未満、例えば約4.5未満などである、可溶性アラビノキシラン基質（WE-A X）における活性の、不溶性アラビノキシラン基質（WU-A X）アラビノキシラン基質における活性に対する比率を有する。

【0107】

いくつかの実施形態では、本発明に従う酵素は、40～70℃の範囲、例えば45～65℃の範囲、例えば50～65℃の範囲、例えば55～65℃の範囲などの温度最適条件を有する。

10

【0108】

いくつかの実施形態では、本発明に従う酵素は、配列番号1～18から選択されるいずれか1つのアミノ酸配列、またはその任意の機能性断片と少なくとも81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98または99%の同一性を有する。

【0109】

いくつかの実施形態では、本発明に従う酵素は、350未満のアミノ酸、例えば340未満、例えば330未満、例えば320未満、例えば310未満、例えば300未満などのアミノ酸、例えば200～350の範囲、例えば220～345の範囲などのアミノ酸の総数を有する。

20

【0110】

いくつかの実施形態では、本発明に従う前記酵素のアミノ酸配列は、配列番号1～18から選択されるいずれか1つのアミノ酸配列、またはその任意の機能性断片と比較して、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸置換を有する。

【0111】

いくつかの実施形態では、本発明に従う前記酵素のアミノ酸配列は、配列番号1～18から選択されるいずれか1つのアミノ酸配列、またはその任意の機能性断片と比較して、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸置換を有する。

30

【0112】

いくつかの実施形態では、本発明に従う酵素は、配列番号1～18のいずれか1つ、またはその任意の機能性断片によって同定されるアミノ酸配列を含む。

【0113】

いくつかの実施形態では、本発明に従う酵素は、配列番号1～18のいずれか1つ、またはその任意の機能性断片によって同定されるアミノ酸配列からなる。

【0114】

本発明のさらに重要な態様は、本発明に従うエンドー1, 4-β-キシラナーゼ活性を示す酵素を、いずれか1つまたは複数のβ-グルカナーゼと組み合わせて含む組成物に関する。いくつかの実施形態では、この1つまたは複数のβ-グルカナーゼは本発明に従う。

40

【0115】

本発明のさらに重要な態様は、本発明に従うエンドー1, 3(4)-β-グルカナーゼ活性を示す酵素を、いずれか1つまたは複数のキシラナーゼと組み合わせて含む組成物である。いくつかの実施形態では、この1つまたは複数のキシラナーゼは、本発明に従うエンドー1, 4-β-キシラナーゼ活性を示す酵素である。いくつかの実施形態では、この1つまたは複数のキシラナーゼは、配列番号17および/または配列番号18、またはその任意の機能性断片に従う酵素である。

【0116】

いくつかの実施形態では、エンドー1, 4-β-キシラナーゼ活性を示す酵素と、エン

50

ドー１，３（４）－β－グルカナーゼ活性を示す酵素との組み合わせは、以下の表に従う：

【０１１７】

【表１】

第１の酵素 (キシラナーゼ) 第２の酵素 (グルカナーゼ)	配列番号１	配列番号２	配列番号３	配列番号４	配列番号５	配列番号６	配列番号１７	配列番号１８
配列番号７	X	X	X	X	X	X	X	X
配列番号８	X	X	X	X	X	X	X	X
配列番号９	X	X	X	X	X	X	X	X
配列番号１０	X	X	X	X	X	X	X	X
配列番号１１	X	X	X	X	X	X	X	X
配列番号１２	X	X	X	X	X	X	X	X
配列番号１３	X	X	X	X	X	X	X	X
配列番号１４	X	X	X	X	X	X	X	X
配列番号１５	X	X	X	X	X	X	X	X
配列番号１６	X	X	X	X	X	X	X	X

【０１１８】

エンドー１，４－β－キシラナーゼ活性を示す酵素である上記の第１の酵素の組み合わせのいずれか１つは、エンドー１，３（４）－β－グルカナーゼ活性を示す酵素の１つと組み合わせることができ、２つの酵素間の比率が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、または１０：１、例えば１：１０～１０：１の範囲内、例えば２：１０～１０：２、例えば３：１０～１０：３、例えば４：１０～１０：４、例えば５：１０～１０：５、例えば６：１０～１０：６、例えば７：１０～１０：７、例えば８：１０～１０：８、例えば９：１０～１０：９の範囲内であり得ることは理解されるべきである。

【０１１９】

いくつかの実施形態では、本発明に従う組成物は少なくとも２つの酵素の組み合わせを含み、前記２つの酵素、またはそれぞれの配列番号と少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する２つの酵素、またはこれらの任意の機能性断片は、

配列番号１および配列番号７、
配列番号２および配列番号７、
配列番号３および配列番号７、
配列番号４および配列番号７、
配列番号５および配列番号７、
配列番号６および配列番号７、
配列番号１７および配列番号７、
配列番号１８および配列番号７、
配列番号１および配列番号８、
配列番号２および配列番号８、
配列番号３および配列番号８、
配列番号４および配列番号８、
配列番号５および配列番号８、
配列番号６および配列番号８、

配列番号 1 7 および配列番号 8、	
配列番号 1 8 および配列番号 8、	
配列番号 1 および配列番号 9、	
配列番号 2 および配列番号 9、	
配列番号 3 および配列番号 9、	
配列番号 4 および配列番号 9、	
配列番号 5 および配列番号 9、	
配列番号 6 および配列番号 9、	
配列番号 1 7 および配列番号 9、	
配列番号 1 8 および配列番号 9、	10
配列番号 1 および配列番号 1 0、	
配列番号 2 および配列番号 1 0、	
配列番号 3 および配列番号 1 0、	
配列番号 4 および配列番号 1 0、	
配列番号 5 および配列番号 1 0、	
配列番号 6 および配列番号 1 0、	
配列番号 1 7 および配列番号 1 0、	
配列番号 1 8 および配列番号 1 0、	
配列番号 1 および配列番号 1 1、	
配列番号 2 および配列番号 1 1、	20
配列番号 3 および配列番号 1 1、	
配列番号 4 および配列番号 1 1、	
配列番号 5 および配列番号 1 1、	
配列番号 6 および配列番号 1 1、	
配列番号 1 7 および配列番号 1 1、	
配列番号 1 8 および配列番号 1 1、	
配列番号 1 および配列番号 1 2、	
配列番号 2 および配列番号 1 2、	
配列番号 3 および配列番号 1 2、	
配列番号 4 および配列番号 1 2、	30
配列番号 5 および配列番号 1 2、	
配列番号 6 および配列番号 1 2、	
配列番号 1 7 および配列番号 1 2、	
配列番号 1 8 および配列番号 1 2、	
配列番号 1 および配列番号 1 3、	
配列番号 2 および配列番号 1 3、	
配列番号 3 および配列番号 1 3、	
配列番号 4 および配列番号 1 3、	
配列番号 5 および配列番号 1 3、	
配列番号 6 および配列番号 1 3、	40
配列番号 1 7 および配列番号 1 3、	
配列番号 1 8 および配列番号 1 3、	
配列番号 1 および配列番号 1 4、	
配列番号 2 および配列番号 1 4、	
配列番号 3 および配列番号 1 4、	
配列番号 4 および配列番号 1 4、	
配列番号 5 および配列番号 1 4、	
配列番号 6 および配列番号 1 4、	
配列番号 1 7 および配列番号 1 4、	
配列番号 1 8 および配列番号 1 4、	50

配列番号 1 および配列番号 1 5、
 配列番号 2 および配列番号 1 5、
 配列番号 3 および配列番号 1 5、
 配列番号 4 および配列番号 1 5、
 配列番号 5 および配列番号 1 5、
 配列番号 6 および配列番号 1 5、
 配列番号 1 7 および配列番号 1 5、
 配列番号 1 8 および配列番号 1 5、
 配列番号 1 および配列番号 1 6、
 配列番号 2 および配列番号 1 6、
 配列番号 3 および配列番号 1 6、
 配列番号 4 および配列番号 1 6、
 配列番号 5 および配列番号 1 6、
 配列番号 6 および配列番号 1 6、
 配列番号 1 7 および配列番号 1 6、ならびに
 配列番号 1 8 および配列番号 1 6、
 からなるリストから選択される。

10

【0120】

いくつかの実施形態では、エンドー 1, 3 (4) - β -グルカナーゼ活性およびエンドー 1, 4 - β -キシラナーゼ活性は、少なくとも 2 つの異なる酵素、例えば 2 つの異なる種からの少なくとも 2 つの異なる酵素などに由来する。

20

【0121】

いくつかの実施形態では、醸造用途において本発明に従う組成物がロータリングの前に使用される場合に、増大される全圧は、470 mmWC 未満、例えば 450 mmWC 未満、例えば 430 mmWC 未満、例えば 410 mmWC 未満、例えば 390 mmWC 未満、例えば 370 mmWC 未満、例えば 350 mmWC 未満、例えば 330 mmWC 未満、例えば 310 mmWC 未満、例えば 300 mmWC 未満、例えば 290 mmWC 未満などの値まで低減される。

【0122】

いくつかの実施形態では、醸造用途においてロータリングの前に使用される場合に、増大される全圧は、前記組成物を含まない負の対照の使用と比較して少なくとも 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 または 95 % だけ低減される。

30

【0123】

いくつかの実施形態では、麦汁分離の前に醸造用途において本発明に従う組成物が使用される場合に、ろ過の 5 分後に捕集される麦汁体積で測定される麦汁のろ過性は、酵素を含まない対照に対して、1.5 を超えて、例えば 1.6 を超えて、例えば 1.7 を超えて、例えば 1.8 を超えて、例えば 1.9 を超えて、例えば 2.0 を超えて、例えば 2.1 を超えて、例えば 2.2 を超えて、例えば 2.3 を超えて、例えば 2.4 を超えて、例えば 2.5 を超えて増大される。

40

【0124】

いくつかの実施形態では、ろ過の 5 分後に捕集される麦汁体積で測定される麦汁のろ過性は、前記組成物を含まない負の対照の使用と比較して少なくとも 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、2

50

80、290、または300%増大される。

【0125】

いくつかの実施形態では、本発明に従う組成物は、いずれか1つまたは複数のさらなる酵素を含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のさらなる酵素は、EC3.2.1.32、EC3.2.1.136、またはEC3.2.1.156に分類されるキシナーゼ、セルラーゼ、ラミナリナーゼ、エンド-1,5- α -L-アラビナーゼ、ベーター-D-グルコシドグルコヒドロラーゼ、 β -キシロシダーゼ、セロビオヒドロラーゼ、グルカン1,4-ベーターグルコシダーゼ、キシログルカン特異的エキソベーター1,4-グルカナナーゼおよび α -N-アラビノフラノシダーゼからなるリストから選択される。

10

【0126】

本明細書において言及される配列によって同定され、本発明に従って単独で、あるいは他の酵素または化合物と組み合わせて使用される配列および酵素は、シグナルペプチドを有していてもいなくてもよい。

【0127】

アッセイ

DNSセルラーゼ活性方法 (DNS CMC方法)

系統名: 1,4-(1,3;1,4)- β -D-グルカン4-グルカノヒドロラーゼ

IUB番号: EC3.2.1.4

【0128】

原理

セルラーゼのアッセイは、 β -1,4-グルカンであるカルボキシメチルセルロース (CMC) の1,4- β -D-グルコシド結合の酵素的なエンド加水分解に基づく。反応の生成物 (β -1,4-グルカンオリゴ糖) は、3,5-ジニトロサリチル酸試薬を用いて、結果として生じる還元性基の増大を測定することによって、比色測定で決定した。酵素活性は、グルコース当量としての還元性基の濃度と、540nmにおける吸光度との間の関係から計算した。

20

【0129】

アッセイはpH5.0で実行したが、酵素の付加的な特徴付けおよび特定化のために、異なるpH値で実施することができる。

30

【0130】

単位の定義

セルラーゼ活性の1つの単位は、アッセイの条件 (pH5.0 (または指定される通り) および50℃) 下で1分につき1 μ molのグルコース当量を生じる酵素の量として定義される。

【0131】

材料

カルボキシメチルセルロース。供給業者: Megazyme Ltd。製品番号: CM-セルロース4M

D-グルコース 'AnalaR'。供給業者: Merck Ltd (BDH)。製品番号: 10117。M.W.: 180.16

40

無水酢酸ナトリウム 'AnalaR'。供給業者: Merck Ltd (BDH)。製品番号: 10236。M.W.: 82.03

酢酸 (「氷」) 'AnalaR'。供給業者: Merck Ltd (BDH)。製品番号: 10001。M.W.: 60.05

3,5-ジニトロサリチル酸GPR (3,5-ジニトロ-2-ヒドロキシ安息香酸)。供給業者: Merck Ltd (BDH)。製品番号: 28235

水酸化ナトリウムペレット 'AnalaR'。供給業者: Merck Ltd (BDH)。製品番号: 10252。M.W.: 40.00

(+) -酒石酸カリウムナトリウム 'AnalaR'。供給業者: Merck Lt

50

d (BDH)。製品番号：10219。M. W. : 282.22

0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.0 中 1.5% (w/v 溶液) のカルボキシメチルセルロース (CMC) 溶液 (基質溶液)

3, 5-ジニトロサリチル酸 (DNS) 溶液。32 g/L の水酸化ナトリウムペレット、および 600 g/L の (+) - 酒石酸カリウムナトリウムを含有する緩衝液中 20 g/L の DNS

グルコース標準溶液 (0.50 mg/ml)

【0132】

手順

酵素組成物をサンプル中に希釈し、0、0.125、0.25、0.375、および 0.5 mg/ml のグルコース濃度を用いて、図 2 に示されるグルコース標準曲線を作成した。

10

【0133】

0.25 ml の酵素溶液を 50℃ で 1.75 ml の基質溶液 (1.5% w/v) と混合し、10 分後に DNS 溶液の添加により反応を停止させた。この後、95℃ で 5 分間加熱した。

【0134】

光学濃度は、異なるサンプルについて 540 nm で測定した ($OD_{540\text{ nm}}$)。

【0135】

計算

20

酵素活性は、図 2 に示される標準曲線から決定される。

【0136】

活性は次のように計算される：

【数 1】

$$\text{活性 (u.ml}^{-1} \text{または u.g}^{-1}\text{)} = \frac{T-c}{m} \times A \times \frac{1}{180.16} \times 10^3 \times \frac{1}{V} \times \frac{1}{t} \times D$$

式中：

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

30

$$= OD_{540\text{ nm TEST}} - OD_{540\text{ nm BLANK}}$$

m = 標準曲線の勾配 (約 1.0)

c = 標準曲線の y 軸切片 (常に負であり、そして約 -0.02)

180.16 ≡ グルコースの分子量

10^3 ≡ μmol へ変換するため

A ≡ アッセイ体積 (ml)

V ≡ 酵素体積 (ml)

t ≡ アッセイ時間 (分)

D = 実際の酵素希釈因子 (例えば、1.000 g を 1 リットルに希釈する場合、D = 1000)

40

【0137】

ラミナリナーゼ (DNS ラミナリン方法)

原理

ラミナリナーゼによって触媒される反応は、1, 3-β-D-グルカンの 1, 3-グルコシド結合のエンド加水分解を含む。基質には、ラミナリン、パラミロンおよびパキマンが含まれる。反応の生成物 (β-1, 3-グルカンオリゴ糖) は、3, 5-ニトロサリチル酸試薬を用いて、結果として生じる還元性基の増大を測定することによって、比色測定で決定される。酵素活性は、グルコース当量としての還元性基の濃度と、540 nm における吸光度との間の関係から計算される。

【0138】

50

アッセイは pH 5.0 および 50℃ で実行したが、酵素の付加的な特徴付けおよび特定化のために、異なる pH および温度の値で実施することができる。

【0139】

単位の定義

ラミナリナーゼ活性の1つの単位は、アッセイの条件（pH 5.0 および 50℃（または指定される通り））下で1分につき1 μmol のグルコース当量を生じる酵素の量として定義される。

【0140】

材料

セルラーゼ活性アッセイについて上記で与えられた材料を参照。

10

【0141】

ラミナリン（ラミナリア・ディギタータ（*Laminaria digitata*）由来）。供給業者：Sigma-Aldrich Co. Ltd. 製品番号：L9634

1.00%（w/v 溶液）ラミナリン溶液（基質溶液 0.1 M の酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.0）

【0142】

1.75 ml のラミナリン溶液は 50℃ で 10 分間 0.25 ml の希釈酵素溶液と混合され、反応は、2 ml の DNS 溶液の添加により停止される。

【0143】

0、0.125、0.25、0.5 および 0.75 mg/ml のグルコース溶液を用いて標準曲線を作成した。

20

【0144】

光学濃度は 540 nm で測定した（OD_{540 nm}）。

【0145】

計算

活性は次のように計算される：

【数2】

$$\text{活性 (u.ml}^{-1} \text{または u.g}^{-1}) = \frac{T-c}{m} \times A \times \frac{1}{180.16} \times 10^3 \times \frac{1}{V} \times \frac{1}{t} \times D$$

30

式中：

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

$= OD_{540 \text{ nm TEST}} - OD_{540 \text{ nm BLANK}}$

$m =$ 標準曲線の勾配（約 1.0）

$c =$ 標準曲線の y 軸切片（常に負であり、そして約 -0.03）

180.16 ≡ グルコースの分子量

$10^3 \equiv \mu\text{mol}$ へ変換するため

$A \equiv$ アッセイ体積（ml）

$V \equiv$ 酵素体積（ml）

40

$t \equiv$ アッセイ時間（分）

$D =$ 酵素希釈因子（例えば、1 g を 1 リットルに希釈する場合、 $D = 1000$ ）

【0146】

アラビナーゼアッセイ

原理

アラビナーゼ活性のアッセイは、3,5-ジニトロサリチル酸試薬を用いて、結果として生じる還元性基の増大を測定することにより、比色測定による決定に基づく。酵素活性は、アラビノース当量としての還元性基の濃度と、540 nm における吸光度との間の関係から計算した。

【0147】

50

アッセイは pH 3.5 で実行したが、酵素の付加的な特徴付けおよび特定化のために、異なる pH 値で実施することができる。

【0148】

単位の定義

アラビナーゼ（アラビナナーゼ（エンドー１，５－アルファーＬ－アラビナナーゼ））活性の１つの単位は、アッセイの条件（pH 3.5（または指定される通り）および 50℃）下で１分につき 1 μmol のグアラビノース当量を生じる酵素の量として定義される。

【0149】

材料

Megazyme 砂糖大根アラビナン

アラビノース Sigma A3131 M. W. : 150.1

酢酸ナトリウム無水 'AnalaR'。供給業者：Merck Ltd (BDH)。製品番号：10236。M. W. : 82.03

酢酸（「氷」）'AnalaR'。供給業者：Merck Ltd (BDH)。製品番号：10001。M. W. : 60.05

3, 5－ジニトロサリチル酸 GPR (3, 5－ジニトロ－2－ヒドロキシ安息香酸)。供給業者：Merck Ltd (BDH)。製品番号：28235

水酸化ナトリウムペレット 'AnalaR'。供給業者：Merck Ltd (BDH)。製品番号：10252。M. W. : 40.00

(+)－酒石酸カリウムナトリウム 'AnalaR'。供給業者：Merck Ltd (BDH)。製品番号：10219。M. W. : 282.22

0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 3.5 中 1.5% (w/v 溶液) のアラビナン溶液（基質溶液）

3, 5－ジニトロサリチル酸 (DNS) 溶液。32 g/L の水酸化ナトリウムペレット、および 600 g/L の (+)－酒石酸カリウムナトリウムを含有する緩衝液中 20 g/L の DNS

アラビナーゼ標準溶液 (0.50 mg/ml)

【0150】

手順

酵素組成物をサンプルに希釈し、0、0.125、0.25、0.375、および 0.5 mg/ml のアラビナーゼ濃度を用いてグルコース標準曲線を作成した。

【0151】

0.25 ml の酵素溶液を 50℃ で 1.75 ml の基質溶液 (1.5% w/v) と混合し、10 分後に DNS 溶液の添加により反応を停止させた。この後、95℃ で 5 分間加熱した。

【0152】

光学濃度は、異なるサンプルについて 540 nm で測定した ($OD_{540\text{ nm}}$)。

【0153】

計算

酵素活性は、標準曲線から決定される。

【0154】

活性は次のように計算される：

【数 3】

$$\text{活性 (u.ml}^{-1}\text{または u.g}^{-1}\text{)} = \frac{T-c}{m} \times A \times \frac{1}{150.13} \times 10^3 \times \frac{1}{V} \times \frac{1}{t} \times D$$

式中：

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

10

20

30

40

50

$$= \text{OD}_{540\text{nm}} \text{TEST} - \text{OD}_{540\text{nm}} \text{BLANK}$$

m = 標準曲線の勾配 (約 1.0)

c = 標準曲線の y 軸切片 (常に負であり、そして約 -0.02)

150.13 ≡ アラビナーゼの分子量

$10^3 \equiv \mu\text{mol}$ へ変換するため

A ≡ アッセイ体積 (ml)

V ≡ 酵素体積 (ml)

t ≡ アッセイ時間 (分)

D = 実際の酵素希釈因子 (例えば、1.000 g を 1 リットルに希釈する場合、D = 1000)

【0155】

アラビノフラノシダーゼアッセイ

α-N-アラビノフラノシダーゼによって触媒される反応は、α-L-アラビノシドの非還元性 α-L-アラビノフラノシド残基における末端結合の加水分解を含む。酵素は、α-L-アラビノフラノシド、(1, 3)-および/または (1, 5)-結合を含有する α-L-アラビナン、アラビノキシランならびにアラビノガラクトタンに作用する。

【0156】

α-N-アラビノフラノシダーゼのアッセイは、p-ニトロフェニル α-L-アラビノフラノシドの酵素的な加水分解に基づく。アッセイは、「継続監視」方法ではなく「2点」方法である。酵素活性の計算は、インキュベーション期間の最初および最後にのみ行われる測定に基づく。反応の生成物の p-ニトロフェノールは、比色測定で決定される (pH 調整の後)。酵素活性は、p-ニトロフェノールの濃度と、400 nm における吸光度との間の関係から計算される。

【0157】

希釈酵素溶液の調製：

全ての酵素溶液を、ガラス蒸留水を用いて粉末または液体酵素調製物から調製する。少量の体積または重量を伴う大きい希釈工程を回避することによって、アッセイ希釈誤差を最小限にする。酵素希釈物を作る際、液体サンプルについても、初期酵素サンプルを検量することがより正確である。これを行う場合、従って、液体サンプルの場合には 20℃ の液体の比重を測定することが必要である。

【0158】

アッセイは「継続監視」方法ではなく「2点」方法であるので、異なる酵素系および条件によりインキュベーション期間内の直線性を保証することが重要である。基質濃度、pH、温度およびアッセイ時間の標準アッセイ条件下、アッセイは、 $\Delta \text{OD}_{540\text{nm}} \text{TEST} (T) = 0.20 \sim 1.50$ の範囲内で直線的であることが実証された。しかしながら、優れた実施のためには、アッセイは、 $\Delta \text{OD}_{540\text{nm}} \text{TEST} (T) = 0.400 \sim 0.800$ の画定範囲内で行われる。

【0159】

手順

各酵素サンプルアッセイは、3つの分析：2重試験 (TEST) 分析およびブランク (BLANK) 分析を含む。与えられる手順には、単一の酵素サンプルの分析が記載される。

【0160】

【表2】

	TEST	BLANK
0.2M酢酸ナトリウム緩衝液、pH5.0	1.00 ml	1.00 ml
ガラス蒸留水	1.00 ml	1.00 ml
p-ニトロフェニル-α-L-アラビノフラノシド溶液	1.00 ml	1.00 ml

10

20

30

40

50

【0161】

0.25 ml の希釈酵素溶液を 50℃ で溶液に添加し、10 分後に 4 ml の 0.4 M グリシン溶液、pH 10.8（停止試薬）の添加により反応を停止させた。

【0162】

吸光度は、25℃において水のブランクに対して 400 nm で測定した。

- ・ 測定した 2 重 TESTS について $OD_{400\text{nm}} \text{ TEST}$ を決定。
- ・ $OD_{400\text{nm}} \text{ BLANK}$ を決定。

【0163】

計算

【数 4】

10

$$\Delta OD_{400\text{nm}} \text{ TEST (T)} = OD_{400\text{nm}} \text{ TEST} - OD_{400\text{nm}} \text{ BLANK}$$

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

$$\text{活性 } (\text{u} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ 対 } \mu\text{g}^{-1}) = \text{単位} \times \frac{1}{E} \times D$$

式中：

20

$T = OD_{400\text{nm}} \text{ TEST} - OD_{400\text{nm}} \text{ BLANK}$

$18300 = \text{p-ニトロフェノールのモル吸光係数 (1 cm 経路長)}$

$V = 7.25$ （試験における全液体体積 (ml)）

$t = 10$ （分）

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

$E = 0.25$ （希釈酵素サンプルの体積 (ml)）

$D = \text{酵素希釈因子}$ （例えば、1 ml を 1 リットルに希釈する場合、 $D = 1000$ ）

【0164】

セロビオヒドロラーゼアッセイ

原理

30

セロビオヒドロラーゼによって触媒される反応は、セルロースおよびセロテトラオースの 1, 4-β-D-グルコシド結合の加水分解を含み、鎖の非還元性端部からセロビオースが放出される。

【0165】

セロビオヒドロラーゼのアッセイは、p-ニトロフェニル β-D-セロビオピラノシドの酵素的な加水分解に基づく。反応の生成物の p-ニトロフェノールは、比色測定で決定される（pH 調整の後）。酵素活性は、p-ニトロフェノールの濃度と、400 nm における吸光度との間の関係から計算される。

【0166】

アッセイは、 $\Delta OD_{540\text{nm}} \text{ TEST (T)} = 0.400 \sim 0.800$ の直線的な画

40

定範囲内で行われる。

【0167】

手順

各酵素サンプルアッセイは、3つの分析：2重試験（TEST）分析およびブランク（BLANK）分析を含む。与えられる手順には、単一の酵素サンプルの分析が記載される。

【0168】

【表 3】

	TEST	BLANK
0.2M酢酸ナトリウム緩衝液、pH5.0	1.00 ml	1.00 ml
ガラス蒸留水	1.00 ml	1.00 ml
p-ニトロフェニルβ-D-セロビオピラノシド溶液	1.00 ml	1.00 ml

【0169】

0.25mlの希釈酵素溶液を50℃で試験溶液に添加し、30分後に4mlの0.4Mグリシン溶液、pH10.8（停止試薬）を各管に添加した。

10

【0170】

吸光度は、1cmのガラスキューベット中400nmにおいて、水のブランクに対して20℃で測定した。

- ・測定した2重TESTSについてOD400nmTESTを決定。
- ・OD400nmBLANKを決定。

【0171】

計算

【数5】

$$\Delta OD_{400nm} TEST (T) = OD_{400nm} TEST - OD_{400nm} BLANK \quad 20$$

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

$$\text{活性} (\text{u} \cdot \text{ml}^{-1} \text{または} \text{u} \cdot \text{g}^{-1}) = \text{単位} \times \frac{1}{E} \times D$$

式中：

$$T = OD_{400nm} TEST - OD_{400nm} BLANK$$

$$18300 = p\text{-ニトロフェノールのモル吸光係数} (1\text{cm経路長})$$

30

$$V = 7.25 \text{ (試験における全液体体積 (ml))}$$

$$1000 = \text{リットルへ変換するため}$$

$$106 = \mu\text{molへ変換するため}$$

$$t = 30 \text{ (分)}$$

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

$$E = 0.25 \text{ (希釈酵素サンプルの体積 (ml))}$$

$$D = \text{酵素希釈因子 (例えば、1mlを1リットルに希釈する場合、} D = 1000 \text{)}$$

【0172】

番号付けされた本発明に従う実施形態：

1. エンドー1, 4-β-キシラナーゼ活性を示す酵素であって、本酵素は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号17、および配列番号18から選択されるいずれか1つ、またはその任意の機能性断片と少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0173】

2. 実施形態1に従う酵素であって、本酵素は、約7.0未満、例えば約6.5未満、例えば約6.0未満、例えば約5.5未満、例えば約5.0未満、例えば約4.5未満などである、可溶性アラビノキシラン基質（WE-AX）における活性の、不溶性アラビノキシラン基質（WU-AX）アラビノキシラン基質における活性に対する比率を有する。

。

【0174】

50

3. エンドー 1, 3 (4) - β -グルカナーゼ活性を示す酵素であって、本酵素は、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、および配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16 から選択されるいずれか 1 つ、またはその任意の機能性断片と少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0175】

4. 実施形態 1 ~ 3 のいずれか 1 つに従う酵素であって、本酵素は、40 ~ 70 °C の範囲、例えば 45 ~ 65 °C の範囲、例えば 50 ~ 65 °C の範囲、例えば 55 ~ 65 °C の範囲などの温度最適条件を有する。

【0176】

5. 実施形態 1 ~ 4 のいずれか 1 つに従う酵素であって、前記酵素は、配列番号 1 ~ 18 から選択されるいずれか 1 つのアミノ酸配列、またはその任意の機能性断片と少なくとも 81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98 または 99 % の同一性を有する。

【0177】

6. 350 未満のアミノ酸、例えば 340 未満、例えば 330 未満、例えば 320 未満、例えば 310 未満、例えば 300 未満などのアミノ酸、例えば 200 ~ 350 の範囲、例えば 220 ~ 345 の範囲などのアミノ酸の総数を有する、実施形態 1 ~ 5 のいずれか 1 つに従う酵素。

【0178】

7. 実施形態 1 ~ 6 のいずれか 1 つに従う酵素であって、前記酵素のアミノ酸配列は、配列番号 1 ~ 18 から選択されるいずれか 1 つのアミノ酸配列、またはその任意の機能性断片と比較して、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個のアミノ酸置換を有する。

【0179】

8. 実施形態 1 ~ 7 のいずれか 1 つに従う酵素であって、前記酵素のアミノ酸配列は、配列番号 1 ~ 18 から選択されるいずれか 1 つのアミノ酸配列、またはその任意の機能性断片と比較して、最大 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個のアミノ酸置換を有する。

【0180】

9. 実施形態 1 ~ 8 のいずれか 1 つに従う酵素であって、本酵素は、配列番号 1 ~ 18 のいずれか 1 つ、またはその任意の機能性断片によって同定されるアミノ酸配列を含む。

【0181】

10. 実施形態 1 または 3 のいずれか 1 つに従う酵素であって、本酵素は、配列番号 1 ~ 18 のいずれか 1 つ、またはその任意の機能性断片によって同定されるアミノ酸配列からなる。

【0182】

11. 実施形態 1 ~ 10 のいずれか 1 つに従う酵素をコードする DNA 配列を含む DNA 構築物。

【0183】

12. 実施形態 11 に従う DNA 構築物を含む組換え発現ベクター。

【0184】

13. 実施形態 11 の DNA 構築物または実施形態 12 のベクターで形質転換された細胞。

【0185】

14. 実施形態 1 ~ 10 のいずれか 1 つに従う酵素、または実施形態 11 に従う DNA 構築物、または実施形態 12 に従うベクター、または実施形態 13 に従う細胞を含む調製物。

【0186】

10

20

30

40

50

15. 実施形態1、2、4～10のいずれか1つに従うエンドー1、4-β-キシラナーゼ活性を示す酵素を、いずれか1つまたは複数のβ-グルカナーゼと組み合わせて含む組成物。

【0187】

16. 実施形態15に従う組成物であって、前記1つまたは複数のβ-グルカナーゼは、実施形態3～10のいずれか1つに従うエンドー1、3(4)-β-グルカナーゼ活性を示す酵素である。

【0188】

17. 実施形態3～10のいずれか1つに従うエンドー1、3(4)-β-グルカナーゼ活性を示す酵素を、いずれか1つまたは複数のキシラナーゼと組み合わせて含む組成物。

10

【0189】

18. 実施形態17に従う組成物であって、前記1つまたは複数のキシラナーゼは、実施形態1、2、4～10のいずれか1つに従うエンドー1、4-β-キシラナーゼ活性を示す酵素である。

【0190】

19. 実施形態15～18のいずれか1つに従う組成物であって、前記エンドー1、3(4)-β-グルカナーゼ活性および前記エンドー1、4-β-キシラナーゼ活性は、少なくとも2つの異なる酵素、例えば2つの異なる種からの少なくとも2つの異なる酵素などに由来する。

20

【0191】

20. 少なくとも2つの酵素の組み合わせを含む、実施形態15～19のいずれか1つに従う組成物であって、前記2つの酵素、またはそれぞれの配列番号と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する2つの酵素、またはこれらの任意の機能的断片が、

配列番号1および配列番号7、

配列番号2および配列番号7、

配列番号3および配列番号7、

配列番号4および配列番号7、

配列番号5および配列番号7、

30

配列番号6および配列番号7、

配列番号17および配列番号7、

配列番号18および配列番号7、

配列番号1および配列番号8、

配列番号2および配列番号8、

配列番号3および配列番号8、

配列番号4および配列番号8、

配列番号5および配列番号8、

配列番号6および配列番号8、

配列番号17および配列番号8、

40

配列番号18および配列番号8、

配列番号1および配列番号9、

配列番号2および配列番号9、

配列番号3および配列番号9、

配列番号4および配列番号9、

配列番号5および配列番号9、

配列番号6および配列番号9、

配列番号17および配列番号9、

配列番号18および配列番号9、

配列番号1および配列番号10、

50

配列番号 2 および配列番号 1 0、	
配列番号 3 および配列番号 1 0、	
配列番号 4 および配列番号 1 0、	
配列番号 5 および配列番号 1 0、	
配列番号 6 および配列番号 1 0、	
配列番号 1 7 および配列番号 1 0、	
配列番号 1 8 および配列番号 1 0、	
配列番号 1 および配列番号 1 1、	
配列番号 2 および配列番号 1 1、	
配列番号 3 および配列番号 1 1、	10
配列番号 4 および配列番号 1 1、	
配列番号 5 および配列番号 1 1、	
配列番号 6 および配列番号 1 1、	
配列番号 1 7 および配列番号 1 1、	
配列番号 1 8 および配列番号 1 1、	
配列番号 1 および配列番号 1 2、	
配列番号 2 および配列番号 1 2、	
配列番号 3 および配列番号 1 2、	
配列番号 4 および配列番号 1 2、	
配列番号 5 および配列番号 1 2、	20
配列番号 6 および配列番号 1 2、	
配列番号 1 7 および配列番号 1 2、	
配列番号 1 8 および配列番号 1 2、	
配列番号 1 および配列番号 1 3、	
配列番号 2 および配列番号 1 3、	
配列番号 3 および配列番号 1 3、	
配列番号 4 および配列番号 1 3、	
配列番号 5 および配列番号 1 3、	
配列番号 6 および配列番号 1 3、	
配列番号 1 7 および配列番号 1 3、	30
配列番号 1 8 および配列番号 1 3、	
配列番号 1 および配列番号 1 4、	
配列番号 2 および配列番号 1 4、	
配列番号 3 および配列番号 1 4、	
配列番号 4 および配列番号 1 4、	
配列番号 5 および配列番号 1 4、	
配列番号 6 および配列番号 1 4、	
配列番号 1 7 および配列番号 1 4、	
配列番号 1 8 および配列番号 1 4、	
配列番号 1 および配列番号 1 5、	40
配列番号 2 および配列番号 1 5、	
配列番号 3 および配列番号 1 5、	
配列番号 4 および配列番号 1 5、	
配列番号 5 および配列番号 1 5、	
配列番号 6 および配列番号 1 5、	
配列番号 1 7 および配列番号 1 5、	
配列番号 1 8 および配列番号 1 5、	
配列番号 1 および配列番号 1 6、	
配列番号 2 および配列番号 1 6、	
配列番号 3 および配列番号 1 6、	50

配列番号 4 および配列番号 16、
 配列番号 5 および配列番号 16、
 配列番号 6 および配列番号 16、
 配列番号 17 および配列番号 16、ならびに
 配列番号 18 および配列番号 16、
 からなるリストから選択される。

【0192】

21. 実施形態 15～20 のいずれか 1 つに従う組成物であって、醸造用途においてロータリングの前に使用される場合に、増大される全圧は、470 mmWC 未満、例えば 450 mmWC 未満、例えば 430 mmWC 未満、例えば 410 mmWC 未満、例えば 390 mmWC 未満、例えば 370 mmWC 未満、例えば 350 mmWC 未満、例えば 330 mmWC 未満、例えば 310 mmWC 未満、例えば 300 mmWC 未満、例えば 290 mmWC 未満などの値まで低減される。

10

【0193】

22. 実施形態 15～21 のいずれか 1 つに従う組成物であって、醸造用途においてロータリングの前に使用される場合に、増大される全圧は、前記組成物を含まない負の対照の使用と比較して少なくとも 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 または 95% だけ低減される。

20

【0194】

23. 実施形態 15～22 のいずれか 1 つに従う組成物であって、麦汁分離の前に醸造用途において使用される場合に、ろ過の 5 分後に捕集される麦汁体積で測定される麦汁のろ過性は、酵素を含まない対照に対して、1.5 を超えて、例えば 1.6 を超えて、例えば 1.7 を超えて、例えば 1.8 を超えて、例えば 1.9 を超えて、例えば 2.0 を超えて、例えば 2.1 を超えて、例えば 2.2 を超えて、例えば 2.3 を超えて、例えば 2.4 を超えて、例えば 2.5 を超えて増大される。

【0195】

24. 実施形態 15～23 のいずれか 1 つに従う組成物であって、麦汁分離の前に醸造用途において使用される場合に、ろ過の 5 分後に捕集される麦汁体積で測定される麦汁のろ過性は、前記組成物を含まない負の対照の使用と比較して、少なくとも 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、または 300% だけ増大される。

30

【0196】

25. いずれか 1 つまたは複数のさらなる酵素を含む、実施形態 15～24 のいずれか 1 つに従う組成物。

40

【0197】

26. 実施形態 25 に従う組成物であって、前記 1 つまたは複数のさらなる酵素は、EC 3. 2. 1. 32、EC 3. 2. 1. 136、または EC 3. 2. 1. 156 に分類されるキシラナーゼ、セルラーゼ、ラミナリナーゼ、エンドー 1, 5- α -L-アラビナーゼ、ベーター D-グルコシドグルコヒドロラーゼ、 β -キシロシダーゼ、セロビオヒドロラーゼ、グルカン 1, 4-ベーターグルコシダーゼ、キシログルカン特異的エキソベーター 1, 4-グルカナーゼおよび α -N-アラビノフラノシダーゼからなるリストから選択される。

【0198】

27. 実施形態 1～10 に従う酵素、または実施形態 14 に従う調製物、または実施

50

形態 15～26 のいずれか 1 つに従う組成物の、食料、飼料、または麦芽飲料製品の製造における使用。

【0199】

28. 実施形態 1～10 に従う酵素、または実施形態 14 に従う調製物、または実施形態 15～26 のいずれか 1 つに従う組成物の、生地または焼き製品の製造における使用。

【0200】

29. 実施形態 1～10 に従う酵素、または実施形態 14 に従う調製物、または実施形態 15～26 のいずれか 1 つに従う組成物の、パルプまたは紙の調製における使用。

【0201】

30. 実施形態 1～10 に従う酵素、または実施形態 14 に従う調製物、または実施形態 15～26 のいずれか 1 つに従う組成物の、穀類成分の調製のための使用。

【0202】

31. 実施形態 29 に従う使用であって、穀類はライ麦、小麦、または大麦である。

【0203】

32. 実施形態 1～10 に従う酵素、または実施形態 14 に従う調製物、または実施形態 15～26 のいずれか 1 つに従う組成物の、ビールの製造または醸造プロセスからの副産物の改変における使用。

【0204】

33. 実施形態 1～10 に従う酵素、または実施形態 14 に従う調製物、または実施形態 15～26 のいずれか 1 つに従う組成物の、ワインまたはジュースの製造における使用。

【0205】

34. 実施形態 1～10 に従う酵素、または実施形態 14 に従う調製物、または実施形態 15～26 のいずれか 1 つに従う組成物の、バイオエタノールなどの第 1 または第 2 世代バイオ燃料の製造における使用。

【0206】

35. デンプンを含む材料のろ過性を変更する方法であって、前記方法は、実施形態 1～10 に従う酵素、または実施形態 14 に従う調製物、または実施形態 15～26 のいずれか 1 つに従う組成物により前記デンプンを含む材料を処理するステップを含む。

【0207】

36. 醸造用途においてロータリングの間に増大される圧力を低減する方法であって、前記方法は、実施形態 1～10 に従う酵素、または実施形態 14 に従う調製物、または実施形態 15～26 のいずれか 1 つに従う組成物で醸造マッシュを処理するステップを含む。

【0208】

37. 食料、飼料、または飲料製品、例えばアルコールまたはノンアルコール飲料、例えばビールまたはウイスキーのような穀類または麦芽ベースの飲料の製造のための方法であって、前記方法は、実施形態 1～10 に従う酵素、または実施形態 14 に従う調製物、または実施形態 15～26 のいずれか 1 つに従う組成物によりデンプンを含む材料を処理するステップを含む。

【0209】

38. 醸造マッシュの製造のための方法であって、前記方法は、実施形態 1～10 に従う酵素、または実施形態 14 に従う調製物、または実施形態 15～26 のいずれか 1 つに従う組成物によりデンプンを含む材料を処理するステップを含む。

【0210】

39. バイオエタノールなどの第 1 または第 2 世代バイオ燃料の製造のための方法であって、前記方法は、実施形態 1～10 に従う酵素、または実施形態 14 に従う調製物、または実施形態 15～26 のいずれか 1 つに従う組成物によりデンプンを含む材料を処理するステップを含む。

10

20

30

40

50

【0211】

40. 実施形態38～39のいずれか1つに従う方法によって得られる製品。

【0212】

41. 実施形態40に従う製品を含み、例えば、この製品が0.1%～99.9%の範囲であるような組成物。

【実施例】

【0213】

実施例1

醸造用途のために提出するキシラナーゼ／グルカナーゼに関する方法および結果

【0214】

以下の方法は、醸造における用途を有するキシラナーゼおよびグルカナーゼをスクリーニングするために使用されている。

【0215】

方法：

水抽出可能なアラビノキシラン（WE-A X）キシラナーゼ方法：

このアッセイにおいておよそOD540=0.25～0.30を得るためのサンプル、およびキシロース標準（0、0.125、0.250、0.375および0.500mg/ml蒸留水）を蒸留水中で調製する。t=0分の時点で、1.75mlの可溶性小麦アラビノキシラン（0.1M酢酸ナトリウム／酢酸、pH5中0.5%の小麦アラビノキシラン（PWAXYH、Megazyme, Bray, Ireland））を50℃で試験管に入れる。t=5分の時点で、250μlの酵素溶液を50℃で基質に添加した後、混合する。蒸留水をブランクとして使用する。t=15分の時点で、2mlのDNS溶液（蒸留水中、1%の3,5-ジニトロサリチル酸（DNS）、1.6%の水酸化ナトリウム、30%の酒石酸カリウムナトリウム）を酵素-基質溶液および2.0mlの標準溶液に添加する。サンプル、ブランクおよび標準物添加DNSを、沸騰した水浴（95℃）に5分間入れる。その後、サンプル、ブランクおよび標準物を、25℃の水浴に20分間入れることにより冷却する。分光光度計を用いて、全てのサンプルの光学濃度をOD540で読み取る。サンプルの希釈、研究に取り入れたサンプルの量および標準物に基づいて、サンプルのキシラナーゼ活性を計算することができる。

【0216】

エンドー1, 4-ベーターキシラナーゼWE-A X活性の1つの単位は、上記の条件（水抽出可能なアラビノキシラン（WE-A X）キシラナーゼ方法）下で1分につき1μmolのキシロース当量を生じる酵素の量として定義される。

【0217】

水抽出不能なアラビノキシラン（WU-A X）キシラナーゼ方法：

サンプルを蒸留水中で調製する。t=0分の時点で、1.75mlの不溶性小麦（0.1M酢酸ナトリウム／酢酸、pH5中0.5%の小麦アラビノキシラン（PWAXYI、Megazyme, Bray, Ireland））を50℃で試験管に入れる。t=5分の時点で、250μlの酵素溶液を50℃で基質に添加した後、混合する。蒸留水をブランクとして使用する。t=15分の時点で、サンプルおよびブランクを、沸騰した水浴（95℃）に5分間入れる。その後、サンプルおよびブランクを遠心分離して、残存する不溶性基質を沈殿させる。溶液に取り込まれたアラビノキシランの量は、Rouau, X. and Surget, A. (1994), Carbohydrate Polymers, 24, 123-132によって記載される方法を用いて決定される。

【0218】

WU-A Xエンドー1, 4-ベーターキシラナーゼ活性は、上記の条件下で、可溶化されたペントースの量（μgペントース）として定義され、μgペントース／キシラナーゼサンプル1グラムの単位の定義が得られる。

【0219】

キシラナーゼ活性アッセイ

10

20

30

40

50

このアッセイにおいておよそ $OD_{540} = 0.25 \sim 0.30$ を得るためのサンプル、およびキシロース標準（0、0.125、0.250、0.375および0.500 mg/ml 蒸留水）を蒸留水中で調製する。t = 0分の時点で、1.75 mlの可溶性小麦アラビノキシラン（0.1 M 酢酸ナトリウム/酢酸、pH 5中0.5%の小麦アラビノキシラン（PWAXYH, Megazyme, Bray, Ireland））を50℃で試験管に入れる。t = 5分の時点で、250 μ lの酵素溶液を50℃で基質に添加した後、混合する。蒸留水をブランクとして使用する。t = 15分の時点で、2 mlのDNS溶液（蒸留水中、1%の3, 5-ジニトロサリチル酸（DNS）、1.6%の水酸化ナトリウム、30%の酒石酸カリウムナトリウム）を酵素-基質溶液および2.0 mlの標準溶液に添加する。サンプル、ブランクおよび標準物添加DNSを、沸騰した水浴（95℃）に5分間入れる。その後、サンプル、ブランクおよび標準物を、25℃の水浴に20分間入れることにより冷却する。分光光度計を用いて、全てのサンプルの光学濃度を OD_{540} で読み取る。サンプルの希釈、研究に取り入れたサンプルの量および標準物に基づいて、サンプルのキシラナーゼ活性を計算することができる。

10

【0220】

エンド-1, 4-ベーターキシラナーゼWE-AX活性の1つの単位は、上記の条件下で1分につき1 μ molのキシロース当量を生じる酵素の量として定義される。

【0221】

グルカナーゼ活性アッセイ

このアッセイにおいて標準曲線内の OD_{540} を得るためのサンプル、およびグルコース標準（0、0.125、0.250、0.500、および0.750 mg/ml 蒸留水）を蒸留水中で調製する。t = 0分の時点で、1.75 mlの大麦ベーターグルカン（1 M 酢酸ナトリウム/酢酸、pH 5中1.5%の大麦ベーターグルカン（p-BGBM, Megazyme, Bray, Ireland））を50℃で試験管に入れる。t = 5分の時点で、250 μ lの酵素溶液を50℃で基質に添加した後、混合する。蒸留水をブランクとして使用する。t = 15分の時点で、2 mlのDNS溶液（蒸留水中、1%の3, 5-ジニトロサリチル酸（DNS）、1.6%の水酸化ナトリウム、30%の酒石酸カリウムナトリウム）を酵素-基質溶液および2.0 mlの標準溶液に添加する。サンプル、ブランクおよび標準物添加DNSを、沸騰した水浴（95℃）に15分間入れる。その後、サンプル、ブランクおよび標準物を、25℃の水浴に20分間入れることにより冷却する。分光光度計を用いて、全てのサンプルの光学濃度を OD_{540} で読み取る。サンプルの希釈、研究に取り入れたサンプルの量および標準物に基づいて、サンプルのグルカナーゼ活性を計算することができる。

20

30

【0222】

エンド-1, 3(4)- β -グルカナーゼ活性の1つの単位は、アッセイの条件（pH 5.0（または指定される通り）および50℃）下で1分につき1 μ molのグルコース当量を生じる酵素の量として定義される。

【0223】

研究室スケールの醸造用途方法：

3:1（150 ml:50 g グリスト）の水:グリスト比でPilsner麦芽:大麦を75:25の比率で用いて、研究室スケールの醸造用途の研究を行った。最初に、マッシングインおよびpH調整（5.4、2 Mの H_2SO_4 ）の前に水を53℃に予熱した。初期温度に戻ったら（10分間）、マッシングプロファイル（図1を参照）を開始させ、酵素を添加する。従来のプラスチック漏斗およびろ紙（紙フィルタ番号1、24 cm直径、Whatman, England）を用いてマッシングオフ麦汁分離を行う。ろ過性能を、いくつかの他の麦汁パラメータ、すなわち粘度、 β -グルカンおよびペントサンなどと同様に評価した。

40

【0224】

麦汁ろ過を30分間測定した、その後ろ過を終了した。捕集した麦汁を冷却した後、任意のさらなる分析を行った。

50

【0225】

ろ過

ろ過データは、ブランク（外因性酵素が添加されない醸造）に対して、5、10、15 および30分後に捕集された麦汁体積として与えられる。

【0226】

パイロットスケールの醸造

パイロットスケールの醸造施設（2HL容量）でトライアルを実行した。ロータリング および水平k i s e l g u h r ろ過によるビールろ過によって、麦汁分離を行った。

【0227】

「挑戦的な」醸造条件下でグルカナーゼおよびキシラナーゼの組み合わせによるろ過の最適化を評価するために、75%の麦芽および25%の大麦を含む混合グリストを用いて、パイロットスケールの醸造トライアルを実行した。最初に、水：グリスト比を2.8：1（マッシュ開始）に設定し、ロータリングの開始時に3.1：1に増大させた。比較して、フルスケールの醸造所ロータリングではおよそ3.2～3.8の水：グリスト比が一般的である。従って、3.1：1の水：グリスト比という本パイロットトライアル設定は、このスケールの挑戦的な限界にあると考えられる。

10

【0228】

2ローターミルを用いて麦芽および大麦を粉碎乾燥した。約0.7mmのローター距離を用いて大麦および麦芽はいずれも2回製粉した。

【0229】

20

53℃の初期マッシュ温度を目的としてマッシングインを行った。マッシングインの後、2.8：1の水：グリスト比のためのマッシュ体積調整および約5.56へのpH調整（乳酸）などの小さい調整を行った。マッシュの微調整の後、酵素を添加し、図1で与えられるマッシングプロファイルに従った。70℃における糖化休止は15分にプログラムしたが、休止期間は、ヨウ素試験によりデンプンが存在しないことが示されるまで、5分間延長した（Ludwig Narziss and Werner Back, Technische Universitaet Muenchen (Fakultaet fuer Brauwesen, Weihenstephan), Abriss der Bierbrauerei. WILEY-VCH Verlags GmbH Weinheim Germany, 2005）。

30

【0230】

78℃で5分間の休止の後にマッシングオフを開始した。事前に「二重底（false bottom）」の真下の高さまで水が入れたロータータンに、マッシュを移した。ろ過ケーキの沈降のためにマッシュを5分間休止させた。この後、15分間の再循環（140L/h）を行い、ろ過ケーキの沈降および麦汁の透明化を保証した。通常、フルスケール醸造では、ろ過は、所与の麦汁濁度が得られたら開始され得るが、本トライアルでは、再循環を15分で一定に保持し、トライアルの比較を可能にした。ロータリングの間、以下の、時間（分）、捕集された麦汁体積（L）、ろ過ケーキを横切るろ過圧力差（mmWC、mm水柱）、ポンプ容量（%）、麦汁濁度（EBC）およびマッシュ温度（℃）を含むデータを捕集した。

40

【0231】

ろ過中にろ過ケーキを横切って増大される圧力は、麦汁ロータリング性能の標準の設定に寄与する因子であると考えられる。非常に高い圧力差（例えば、第1の麦汁捕集中の250mmWC、および例えば、リマインダーのロータリングについては450mmWC）に到達したら、ろ過ケーキのラッキング（ディープカットとしても知られている）が誘発される。ラッキングは、ろ過ケーキが崩壊するか、あるいは特別に設計されたナイフでろ過ケーキの切断を遅くすることによってろ過チャンネル形成が救済されるプロセスである。ろ過ケーキのラッキングの後、6分間の麦汁再循環（流速：120l/h）を導入し、継続ろ過のためにろ過ケーキを満たした。ろ過ケーキのラッキングはそうでなければ妥協されるろ過性能を救済し、そうでなければ麦汁品質の悪さももたらし得る。圧力により誘発

50

されるラッキングが3回目のスパージングの始まりまでに導入されていなければ、3回目および4回目のスパージングの初めに自動ラッキングを行い、麦汁分離を終了する直前に完全なる過のブロックが生じないことを保証した。

【0232】

ロータリングは、表1に示される設定を用いて行った。

【0233】

【表4】

表1. ロータリング設定。捕集体積(L)、ろ過流量(L/h)およびスパージング体積(L)

麦汁	捕集体積、L	ろ過流量、L/h	スパージング体積、L
最初の麦汁	0 - 60	130	
1回目のスパージング	60 - 78	140	18
2回目のスパージング	78 - 96	160	18
3回目のスパージング	96 - 114	180	18
4回目のスパージング	114 - 140	180	26

【0234】

最後のロータリングの後、麦汁 (sweet wort) をマッシュタンに戻し、加熱して沸騰させ、ホップを添加した。ホッピングを80分間継続させ、ホッピングの最後にpHを5.10±0.05に調整する。渦の使用によりホップを麦汁 (bitter wort) から除去し、その後の麦汁を約8℃に冷却した。発酵のために、Fermentisからの下面発酵乾燥酵母 (サッカロミセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae)) W34/70を選択した。酵母を30分間再水和させ、100g/HLで投入した。主発酵を10℃で5～6日間維持した後、弱毒化およびジアセチルが80ppb未満になるまで、15℃で熟成させた。1℃および0.7バールでビールをさらに2～3週間貯蔵した後、ろ過した。

【0235】

1. 2μmのPPキャンドルプレートおよび珪藻土の使用によりビールを水平にろ過した。ろ過装置には8枚までのプレートが含まれ、約0.5m²の総ろ過面積が得られる。本研究では、3枚のプレートが含まれ、130L/hの流量でろ過を実行し、6.9HL/(h・m²)のろ過速度が得られた。フルスケールの醸造所では、ろ過速度は通常5～7HL/(h・m²)に設定される。従って、本発明の設定は上限であり、醸造プロセスにおける酵素の使用の選択からの潜在的利益を検証するためにビールろ過条件に挑戦する計画的な選択であることが明らかである。ビールろ過中、流量 (L/h) および圧力値 (P-inおよびP-out) を監視して、ビールのろ過性能を検証した。またビール品質を評価するために、元の重力 (Original Gravity) (OG)、見かけの抽出物 (Apparent Extract) (AE)、体積によるアルコール (Alc 40
ohol By Volume) (ABV)、見かけの発酵度 (Apparent Degree of Fermentation) (ADF)、実際の発酵度 (Real Degree of Fermentation) (RDF)、pH、色および苦味などのいくつかのビール分析を実行した。

【0236】

結果：

キシラナーゼ：

キシラナーゼを、可溶性基質および不溶性基質におけるその活性、そのpHおよび温度特性についてスクリーニングした。

【0237】

10

20

30

40

50

結果は表 2 に示される。

【0238】

【表 5】

表2. スクリーニングしたキシラナーゼ、可溶性(WE-AX)および不溶性(WU-AX)アラビノキシラン基質におけるその活性、ならびに温度およびpHに関するその生化学的特徴

名称	起源	GH	WE-AX	WU-AX	WU-AX/WE-AX	Temp opt, °C	T _{1/2} temp, °C	pH opt.
AfuXyn2	アスペルギルス・フミンガタス (<i>Aspergillus fumigatus</i>)	11	7798	68790526	8822	65	59	5.5
AfuXyn3	アスペルギルス・フミンガタス (<i>Aspergillus fumigatus</i>)	11	26283	99716865	3794	60	62	5
AfuXyn5	アスペルギルス・フミンガタス (<i>Aspergillus fumigatus</i>)	11	90005	714363158	7937	60	50	4
BsuXyn3	バチルス・スプチャリス (<i>Bacillus subtilis</i>), BS3	11	82	1095357	13388	50	n.d.	6
BsuXyn4	スプチャリス(<i>subtilis</i>) BS4#160	11	54	1005400	18619	50	n.d.	6
TerXyn1	ゲオスミチア・エメルソニ (<i>Geosmithia emersonii</i>)	10	1467	6208786	4232	78	>78	3
AtuXyn3	アスペルギルス・ツビゲンシス (<i>Aspergillus tubigenensis</i>)	10	1220	7760982	6361	65	67	4.5
AtuXyn4	アスペルギルス・ツビゲンシス (<i>Aspergillus tubigenensis</i>)	11	1600	12934971	8084	45	58	5
AacXyn2	アスペルギルス・アキュリエタス (<i>Aspergillus aculeatus</i>)	10	777	3880491	4994	70	73	4
TreXyn2	トリコデルマ・リーゼイ (<i>Trichoderma reesei</i>)	11	2244	16015846	7137	55	n.d.	5
TreXyn3	トリコデルマ・リーゼイ (<i>Trichoderma reesei</i>)	10	21487	141108772	6567	60	64	5.5
TreXyn5	トリコデルマ・リーゼイ (<i>Trichoderma reesei</i>)	11	1410	8842816	6272	70	68	5
n. d. = 決定されず								

【0239】

WE-AXおよびWU-AX酵素活性(U)は、セクション「水抽出可能なアラビノキシラン(WE-AX)キシラナーゼ方法」および「水抽出不能なアラビノキシラン(WU-AX)キシラナーゼ方法」において記載されるように測定した。

【0240】

生化学的スクリーニングからの結果に基づいて、適用トライアルにおいてさらに試験するために、可溶性対不溶性アラビノキシランにおける適切な活性比を有するキシラナーゼを選択した。結果は表3に示される。

【0241】

10

20

30

【表 6】

表3. スクリーニングしたキシラナーゼ、およびキシラナーゼ対ブランク(キシラナーゼを含まない)を用いて得られた相対的な抽出物収量。
最後に、キシラナーゼ基質特異性は、不溶性対可溶性アラビノキシラン(WU-AX/WE-AX)におけるその活性の比率として示される。

名称	起源	ろ過性能				WU-AX/WE-AX
		5分	10分	15分	30分	
ブランク		1.00	1.00	1.00	1.00	
BsuXyn3	バチルス・スプテリス (<i>Bacillus subtilis</i>), BS3	0.93	0.95	0.96	0.95	13388
BsuXyn4	バチルス・スプテリス (<i>Bacillus subtilis</i>), BS4#160	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	18619
TerXyn1	ゲオスミチア・エメルソニ (<i>Geosmithia emersonii</i>) (タロミセス・エメルソニ (<i>Taleromyces emersonii</i>))	2.19	1.92	1.70	1.44	4232
AtuXyn3	アスペルギルス・ツビゲンシス (<i>Aspergillus tubigenis</i>)	2.06	1.75	1.59	1.37	6361
AtuXyn4	アスペルギルス・ツビゲンシス (<i>Aspergillus tubigenis</i>)	1.02	1.01	1.01	1.01	8084
AacXyn2	アスペルギルス・アキュリエタス (<i>Aspergillus aculeatus</i>)	2.07	1.86	1.67	1.43	4994
TreXyn3	トリコデルマ・リーゼイ (<i>Trichoderma reesei</i>)	2.41	2.02	1.81	1.55	6567
TreXyn5	トリコデルマ・リーゼイ (<i>Trichoderma reesei</i>)	2.06	1.75	1.59	1.37	6272

【0242】

ろ過性能は、前に記載される（「ろ過」）ように測定され、負の対照（ブランク）に対して、異なる時点のろ液体積として示される。

【0243】

WE-AXおよびWU-AX酵素活性（U）は、セクション「水抽出可能なアラビノキシラン（WE-AX）キシラナーゼ方法」および「水抽出不能なアラビノキシラン（WU-AX）キシラナーゼ方法」において記載されるように測定した。

【0244】

グルカナーゼ：

グルカナーゼをその活性および温度特性についてスクリーニングし、結果は表4に示される。

【0245】

10

20

30

【表 7】

表4. スクリーニングしたグルカナーゼ、その活性、および温度に関するその生化学的特徴

名称	起源	U/ml	Temp opt, °C	T½ temp _buff er, °C	T½ temp_wo rt, °C	pH opt.
TerGlu1	タラロマイセス・エメルソニ (<i>Talaromyces emersonii</i>) / ゲオスミチア・エメルソニ (<i>Geosmithia emersonii</i>)	7338	70	78	78	3
BsuGluS	バチルス・スブチリス(<i>Bacillus subtilis</i>)	208	55-65	60	68	5-6
BsuGlu103FUL L	バチルス・スブチリス(<i>Bacillus subtilis</i>)	391	50-60	53	58	5-6
TreGlu2	トリコデルマ・リーゼイ (<i>Trichoderma reesei</i>)	13	40-50	70	74	4.5-6
TreGlu3	トリコデルマ・リーゼイ (<i>Trichoderma reesei</i>)	9215	40-51	58	62	4.5-6
TreGlu4	トリコデルマ・リーゼイ (<i>Trichoderma reesei</i>)	n.d.	40-52	62	62	4.5-6
TreGlu6	トリコデルマ・リーゼイ (<i>Trichoderma reesei</i>)	n.d.	40-53	62	64	4.5-6
TreGlu7	トリコデルマ・リーゼイ (<i>Trichoderma reesei</i>)	n.d.	40-54	62	62	4.5-6
TreGlu8	トリコデルマ・リーゼイ (<i>Trichoderma reesei</i>)	n.d.	40-55	61	63	4.5-6
BsuGluC CBD	バチルス・スブチリス(<i>Bacillus subtilis</i>)	10	50-60	60	67	5-6
n. d. = 決定されず						

10

20

【0246】

グルカナーゼ活性／単位は、上記のグルカナーゼ活性アッセイにおいて記載されるように決定した。

【0247】

生化学的スクリーニングからの結果に基づいて、適用トライアルにおいてさらに試験するために、適切な特性を有するグルカナーゼを選択した。結果は表5に示される。

【0248】

【表 8】

表5. スクリーニングしたグルカナーゼの名称および起源、ならびにグルカナーゼ対ブランク(酵素を含まない)を用いて得られた相対的な抽出物収量

名称	起源	ろ過性能			
		5分	10分	15分	30分
ブランク	負の対照	1.00	1.00	1.00	1.00
TerGlu1	ゲオスミチア・エメルソニ (<i>Geosmithia emersonii</i>)	1.36	1.43	1.46	1.36
BsuGluS	バチルス・スブチリス(<i>Bacillus subtilis</i>)	1.48	1.49	1.48	1.35
BsuGlu103FULL	バチルス・スブチリス(<i>Bacillus subtilis</i>)	1.29	1.28	1.30	1.22
TreGlu2	トリコデルマ・リーゼイ(<i>Trichoderma reesei</i>)	1.15	1.18	1.20	1.15
TreGlu3	トリコデルマ・リーゼイ(<i>Trichoderma reesei</i>)	1.29	1.32	1.30	1.22
TreGlu4	トリコデルマ・リーゼイ(<i>Trichoderma reesei</i>)	1.11	1.11	1.11	1.09
TreGlu6	トリコデルマ・リーゼイ(<i>Trichoderma reesei</i>)	1.13	1.15	1.13	1.10
TreGlu7	トリコデルマ・リーゼイ(<i>Trichoderma reesei</i>)	1.06	n.d.	1.01	1.02
TreGlu8	トリコデルマ・リーゼイ(<i>Trichoderma reesei</i>)	1.12	1.11	1.13	1.09
BsuGluC CBD	バチルス・スブチリス(<i>Bacillus subtilis</i>)	1.33	1.37	1.37	1.32

40

【0249】

50

ろ過性能は、前に記載される（「ろ過」）ように測定され、負の対照（ブランク）に対して、ろ液体積として与えられる。

【0250】

キシラナーゼおよびグルカナーゼの個々のスクリーニングに基づいて、コンビナトリアル実験を行い、結果は表6に示される。

【0251】

【表9】

表6. ブランクおよびUltraFlo(登録商標)Maxに対するキシラナーゼおよびグルカナーゼのコンビナトリアル実験からの醸造用途の結果。250の真菌キシラナーゼUnits FXU-S/g:700のセルラーゼUnits EGU/g(Novozymes, Denmark)の結果は、得られた相対的な抽出物収量として示される。

名称	起源	ろ過性能			
		5分	10分	15分	30分
対照		1.00	1.00	1.00	1.00
UFmax 0.1	A. アキュリエタス(A. aculeatus)	2.29	2.13	2.00	1.77
BsuGluS/TauXyn1	B. sub/T. アウランティアクス(T. aurantiacus)	1.70	1.69	1.60	1.47
BsuGluS/AtuXyn3	B. sub/A. ツピンゲンシス(A. tubingensis)	2.57	2.14	1.96	1.75

(UltraFlo(登録商標)Maxの起源は、国際公開第05059084号パンフレットに記載されるものなどの

A. アキュリエタス(A. aculeatus)以外の微生物を含み得る)

【0252】

ろ過性能は、前に記載される（「ろ過」）ように測定され、負の対照（ブランク）に対して、異なる時点のろ液体積として与えられる。

【0253】

適切な組み合わせを検証のために2HLパイロットスケール施設においてさらに試験し、結果は、表7および図3に示される。

【0254】

【表10】

表7. グルカナーゼおよびキシラナーゼスクリーニングの検証からのパイロットスケールの醸造用途結果。

A. tubキシラナーゼと組み合わせたB. subグルカナーゼSを、ブランクおよびUltraFlo(登録商標)Maxに対して試験した。収集したデータは、平均流量(L/h)、ロータリングの間に増大される全圧(mmWC)、およびロータリングの間に記録された最大圧力(mmWC)であった。

ID	平均流量(L/h)	増大される全圧(mm WC)	最大圧力(mmWC)
ブランク	148	556	356
UltraFlo max	149	478	280
BsuGluS/AtuXyn3	147	263	163

【0255】

実施例2

この実施例では、醸造用途のキシラナーゼが高分子量可溶性アラビノキシラン(HMW S-A X)および水抽出可能なアラビノキシラン(W E-A X)に対して非常に高い選択性を有し得ることを示すことを試みた。本明細書により、限られた量のアラビノキシランだけが可溶化される必要があると考えられる。その結果として、関連のある異臭の可能性が非常に低減される。

【0256】

著しく低減された粘度はマッシュおよびビールの分離を促進する。醸造用途のために所望されるキシラナーゼ特性は、以下の表8の態様のうちの1つまたは複数を含み得る：

【0257】

【表11】

表8： キシラナーゼ選択のためのスクリーニング基準
酵素基質特異性 WE-AX/WU-AX 比は粘度に影響を与える
酵素基質選択性 酵素が切断する分岐点にどれくらい近いかが機能性に影響を与える
酵素熱安定性 マッシング中の AX の連続的な可溶化－熱安定性は重要な特徴である
酵素 pH 最適条件 (pH 5.4 - 5.6)
酵素阻害 (例えば、キシラナーゼの既知の重要な因子)

10

20

【0258】

【表 1 2】

表 9： キシラナーゼー生化学的特徴 内在性の穀類キシラナーゼ阻害剤による阻害は両方のキシラナーゼ GHにおいて生じる		
キシラナーゼ GH	GH10	GH11
Mw	+ 30 kDa	20 kDa
基質特異性	アラビノース置換 の近くで加水分解 する	AX を加水分解するた めにより多くの非置 換キシロースを必要 とする
基質選択性	WE-AX/WU-AX 通常> 1	WE-AX/WU-AX 通常< 1
SBD	多くの場合、別箇 の SBD	典型的な SBD はない が、表面に二次的な BD
技術的効果	粘度低下剤	可溶化剤/ 粘度低下剤

【0 2 5 9】

図 3 に示されるような穀類中の水不溶性アラビノキシラン (WU-AX) は、醸造所ではろ過ケーキの安定性に結び付けられる。

穀類中のフェルラ酸 (FA) の濃度は、非常に大きく組織に依存する。最高濃度は果皮材料において見出され、胚乳中の濃度はそれよりもかなり低い。異なる濃度が報告される。2700 µg/g 不溶性繊維、185 µg/g 可溶性繊維の濃度があり得る (Bunzel et al. 2001, Journal of Sc. of food and agriculture, vol. 81, p. 653-60)。

【0 2 6 0】

これを客観的にとらえると、不溶性繊維 (WU-AX) 中のアラビノキシランの 200 個に 1 個のキシロース分子、および可溶性繊維 (WE-AX) 中の 2500 個に 1 個のキシロースに対してだけ見出される。

【0 2 6 1】

キシラナーゼが遊離フェルラ酸および 4-VG などの異臭形成をビールにもたらすことはよく知られている事実である。

【0 2 6 2】

方法：

10

20

30

40

50

表8および9で言及される基準に基づいて、DuPont Industrial Biosciencesから15個よりも多いキシラナーゼを可能性のある候補として見出した。実験室のマッシング用途において、30%までの大麦を麦芽と組み合わせて適用してキシラナーゼをスクリーニングした。とりわけ、マッシュ分離速度、ペントサン／アラビノキシランレベルおよび麦汁粘度を監視した。我々の仮説を試験し、キシラナーゼ特性を醸造における機能性に結び付けるために、最高の候補をいくつかのパイロット醸造プラント研究において試験した。選択されたキシラナーゼ候補の最適用量をβ-グルカナーゼと組み合わせて試験した。

【0263】

結果および考察：

【0264】

【表13】

表10: サンプル ID	対照	リファレンス (X+B)	X1	X2	X3
Dyn. 粘度 (12 ° プラトー) mPa. s	1.798	1.670	1.801	1.746	1.794
抽出物 (° プラトー)	15.1	15.7	15.6	15.2	15.1
全ペントサン (mg/l)	1610	1910	2440	2020	1710

【0265】

パイロットプラント醸造では、酵素用量が唯一の変数である。WU-A X選択的キシラナーゼ (X1) を適用すると、ろ床の崩壊が生じる。WE-A X選択的キシラナーゼ候補 (リファレンス、X2、X3) は、増大される圧力を低くする。リファレンスは、キシラナーゼおよびベータグルカナーゼのブレンドである。

【0266】

【表14】

表11： 麦汁分析-パイロットプラント研究

サンプル ID	リファレンス	X+B	Xh+B
抽出物 (° プラトー)	15.70	16.00	15.95
麦汁中のベータグルカン (mg/l)	44	35	25
12 ° プラトーにおける Dyn. 粘度 (mPa. s)	1.65	1.68	1.68
全ペントサン (mg/l)	3540	2970	3010

【0267】

【表15】

表12：熟成ビールのストレッカーアルデヒド分析

熟成マーカー (強制熟成ビール)	単位	リファレ ンス	X+B	Xh+B
2-Me-Pr	ppb	25	24	22
2-Me-Bu	ppb	3	2	3
3-Me-Bu	ppb	9	7	8
フルフラール	ppb	113	85	93
メチオナール	ppb	6	5	6
PheAcal	ppb	10	9	10
T2N	ppb	0.022	0.022	0.022

10

20

【0268】

20%大麦／80%麦芽においてβ-グルカナーゼ（B）と組み合わせられた中用量（X）および高用量（Xh）で適用されたWE-A X選択的キシラナーゼの最適化ブレンド。結果は、マッシュおよびビールの良好な分離性能を示し、異臭形成およびろ床崩壊の危険性は低い。

【0269】

結論

30

研究は、マッシングの間にWE-A Xに対して高度に選択的であるキシラナーゼを醸造のために適用することの重要性を証明した。以下の利益が達成される：

- ・ 良好なマッシュ分離およびビールろ過性能
- ・ ロータリング時のろ床崩壊の危険性が最小限
- ・ アラビノキシランの分解に関連する異臭形成の可能性の低下
- ・ キシラナーゼの過剰投与に対する許容性

【0270】

キシラナーゼは、多くの場合、分離制御のためにベーターグルカナーゼと組み合わせて非常に有益な効果を伴って適用することができる。

【0271】

40

実施例3：

2HLパイロット醸造トライアルにおけるX3／Bgls（AtuXyn3／Bsuglsとも呼ばれる）の組み合わせの評価

材料および方法：

実験：酵素：

AtuXyn3（X3）／Bsugls（Bgls）（a）：Bgls（バチルス（Bacillus）グルカナーゼ）およびX3（アスペルギルス（Aspergillus）キシラナーゼ）の組み合わせ（Bgls：0.50mgタンパク質／kgグリスト、およびX3：1.50mgタンパク質／kgグリスト）。

AtuXyn3（X3）／Bsugls（Bgls）（b）：AtuXyn3（X3

50

)/BsuGluS (BglS) (a)と同様であるが、ロバスト性を試験するためにX3用量が20%増大されている。

【0272】

リファレンス：0.20kg/Tグリストで投与される基準酵素製品 (Ultraflo (登録商標) Max)

【0273】

原材料：

添加材料：大麦 22%w/w。

【0274】

麦芽：Pilsner麦芽Chiraz 42, 6%w/w、Pilsner麦芽Quench DMG 35, 4%重量/重量 (ww)。 10

【0275】

pHの酸調整のために使用した全ての材料、カルシウム、亜鉛および苦味は食品グレードであり、標準的な醸造材料であると考えられる。

【0276】

醸造のためのレシピは、国際的なラガービールのようなビールスタイルを目的とする。

【0277】

製粉：

kuenzel 2ローラーパイロットミル。製粉材料をローラーに2回通して4ローラーミルをシミュレートする。 20

【0278】

麦芽グリスト：ミルは、ローラーの第1の通過の際は1.5mm、そして第2の通過の際は0.7mmで運転した。

【0279】

大麦グリスト：ミルは、ローラーの第1の通過の際は1.5mm、そして第2の通過の際は0.4mmで運転した。

【0280】

醸造所2HL：

全ての醸造は、16°プラトー (Plato) を目的として、190L麦汁のHGB (High Gravity Brewing) インフュージョンマッシングおよび標準ロータリングに基づいた。固定流量で実施されるロータリングの間、差圧を記録した (ロータリング性能を評価するためのパラメータとして使用した)。全ての醸造材料を前もって (24時間) 製粉し、水との接触の前は閉鎖バケット内で保持した。マッシング開始後、最初の3分以内に全ての材料をマッシュケトルに投入した。酵素添加の前にカルシウムおよびpH調整を行った。52℃の中断でpH (20℃) を再検査した。72℃で10分後にヨウ素規定度を確認した。ロータリングを78℃で実施した。 30

【0281】

第1の麦汁捕集の間、固定流量において90l/Hでロータリング性能を評価した。スパーキングおよび弱い麦汁捕集の間、流量を110L/時および130L/時に増大させた。冷たい麦汁において化学分析を実施した。 40

【0282】

麦汁沸騰：

外部ボイラーを用いて4~5%の蒸発で沸騰を行った。最終ビール中20BUを目的として、麦汁沸騰の最初からホップ抽出物を添加した。

【0283】

発酵 50L：

全ての発酵を50Lのシリンδροコニカルミル (cylindroconical) タンクにおいて実施した。発酵は、標準的な操作手順に従って行った。15×10⁶生酵母細胞/mlで投入を行った。Nucleoカウンターを用いて酵母カウントおよび生存率を計算した。 50

【0284】

ビール加工：

プレートおよびフレームフィルタは一定の圧力で作動した。流量評価は重量で行った。

【0285】

1および3枚のフィルタプレートからデータを収集した。

【0286】

脱醸造 (debrewing)：

国際的なラガービールの標準であると考えられる5.0%ABV (体積によるアルコール) に、全てのビールを脱醸造した。

【0287】

10

瓶詰め：

CO₂を5.0g/Lに調整した。McLennon自動充てん機において、単一の排出を用いて、全てのビールサンプルを33cl標準ボトルに瓶詰めした。

【0288】

ビール分析：

GC-MSを用いて新鮮なビールを分析した。

【0289】

GC-MSを用いて化学的老化プロファイルを決定した。

【0290】

結果および観察：マッシング

20

以下の条件でマッシングを実施した：

52℃で10分間 (作動中のミルを用いて15～20分のマッシングをシミュレートする)。

65℃で40分間。

72℃で30分間。

78℃で10分間。

【0291】

全ての勾配工程を1℃で実行した。グラフ表示は図7に与えられる。

【0292】

16°プラトー醸造を目的としてこのマッシング体制を用いて全てのトライアルを行った。このプロセス工程に対する所見はなかった。

30

【0293】

結果および観察：ロータリング

2hl醸造所において150kg/m²の負荷でロータリングを実施した。これは、標準的な醸造所操作の代表である。ロータリングプロセスの制御は平均100リットル/時の固定流量で行った。初期流量は、90リットル/時であり、弱い麦汁の捕集の間に130リットル/時まで増大する。4つの醸造について差圧およびヘイズのインライン測定を記録した。ロータリングおよび麦汁捕集全体を約2時間かけて行った。

【0294】

トライアルX3/BglS (b) およびX3/BglS (a) は最良のロータリング性能を有するトライアルであると示唆され、その次がトライアルX3/BglS (a) であり、そしてトライアルUF maxが最低の性能を有する。

40

【0295】

【表 1 6】

表13:4つのトライアルからのマッシュのロータリングの間に収集されたデータ

	UF max	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
ロータータン負荷(kg/m ³)	153	153	153	153
ロータータン時間(分)	154	164	170	154
差圧(cm)	40	30	30	30
ラッキング(#ディーブカット)	1	1	1	1
ヘイズ(EBC)	10	15	10	10
第1の麦汁の増大される圧力(cm/h)	40	33	31	30
最初のディーブカットまでの時間(分)	45	60	120	115

10

【0 2 9 6】

表中の「差圧」および「第1の麦汁の増大される圧力」はcmWC（cm水柱）で測定し、それぞれ（cm）および（cm/h）ではない。

【0 2 9 7】

結果および観察：沸騰後の麦汁分析

冷たい麦汁の分析は同様の結果を示す。ベーターグルカン分析はサンプル間のわずかな違いを示す。

【0 2 9 8】

20

【表 1 7】

表14:冷たい麦汁の化学分析

麦汁	UF max	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
抽出物(%プラトー)	16.09	16.05	15.99	16.1
色(EBC)	9.7	9.3	9.3	9.3
pH	5	5.2	5.2	5.2
ヨウ素(Y/N)	N	N	N	N
苦味(BU, EBC)	52	51	46	50

30

【0 2 9 9】

【表 1 8】

表15: 冷たい麦汁における分析データ

	UF max	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
麦汁中のベーターグルカン(mg/L)	49	40	25	30
12°Cにおけるdyn. 粘度(mPa. s)	1,888	1,685	1,679	1,686
ペントサン(mg/l)	3365	2975	3014	2964
フェルラ酸(ug/ml)	4,3	3,9	3,8	3,9
4-VG(ug/ml)	<0,49	<0,49	<0,49	<0,49

40

(12 °C は12 °プラトー); (%プラトーは°プラトーと交換可能に使用され得る)

【0 3 0 0】

結果および観察：発酵

グリーンビールの分析は表 1 6 に与えられる。

【0 3 0 1】

【表 1 9】

表16:グリーンビール分析

グリーンビール	UF max	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
アルコール(%vol)	6.79	6.79	6.7	6.86
実際の抽出物(%P)	6.28	6	6	6
RDF (%)	63.5	63.7	63.5	64.4
元の抽出物(%P)	16.29	16.25	16.09	16.24
色(EBC)	8.3	8.5	-	-
pH	4.4	4.4	4.4	4.4
SO2 (ppm)	7	9	11	10
苦味(BU, EBC)	29	28	27	27

10

【0 3 0 2】

グリーンビール分析は、トライアル間で高度の類似性を示す。全てのトライアルは相対的に低いR D Fを有するが、これは、重量／重量（w w）基準で計算して2 2 %の大麦を含む場合に通常見られる。

【0 3 0 3】

結果および観察：ビールろ過

固定圧力を使用し、プレートおよびフレームフィルタを用いてビールサンプルをろ過した。約1 5 k gの2つの樽をろ過し、個々の樽のろ過データは表1 7に与えられる。第1の樽は1枚のフィルタシートを用いてろ過し、第2の樽は3枚のフィルタシートを用いてろ過した。差圧は常に0. 5 バールであった。フィルタプレートは、B e g e r o wからのK D 7（2 0 c m×2 0 c m）である。

20

【0 3 0 4】

1枚または3枚のフィルタプレートによるろ過からのろ過曲線の全体像は同じである。1枚のフィルタプレートの記録が敏感すぎて実際の比率の違いを示すことができないと考えられる。

【0 3 0 5】

【表 2 0】

30

表17:4つのトライアルからの樽のろ過データ

ろ過	UF max	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
ろ過速度-1フィルタシート(L/h)	4.8	5.6	9.9	11.8
ろ過速度-3フィルタシート(L/h)	77.2	59.6	70.6	105.4

【0 3 0 6】

結果および観察：最終ビール分析

標準的な操作手順（E B C）に従ってトライアルビールを分析し、表1 8に示す。

40

【0 3 0 7】

【表 2 1】

表18:最終ビール分析

完成ビール	UF max	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
アルコール(%)	4.82	4.89	5.01	4.92
実際の抽出物(%P)	4.5	4.6	4.6	4.4
RDF (%)	63.2	63.4	63.8	64.3
元の抽出物(%P)	11.85	11.99	12.19	11.89
色(EBC)	4.8	4.9	5	5
pH	4.4	4.4	4.4	4.4
SO ₂ (ppm)	13	13	10	6
苦味(BU, EBC)	22	22	20	18
ヘイズ(EBC)	0.43	0.4	0.38	0.4
全ヘイズ-5d-60dgC(EBC)	8.6	12.9	7.3	6.2
CO ₂ (g/L)	4.9	5.3	5.1	5.2
ジアセチル(ppb)	12	11	8	10
ヘッドリテンション(S)	107	111	119	108
泡体積(ml)	452	476	460	470

10

【0308】

結果および観察：最終ビールにおけるストレッカー（Strecke）アルデヒドおよび「熟成マーカー」

20

新鮮および熟成（aged）ビールの両方において分析を実施した。新鮮および熟成ビールの両方において、GC-MSにより、ストレッカーアルデヒドおよび「熟成および熟マーカー」（2-ME-Pr（2-メチルプロパナール）、2-ME-Bu（2-メチルブタナール）、3-ME-Bu（3-メチルブタナール）、フルフラール、メチオナール、PheAcal（フェニルアセトアルデヒド）およびT2N（トランス-2-ノネナール））を分析した。新鮮ビールの分析からのデータは表19に与えられる。

【0309】

【表 2 2】

30

表19:新鮮ビールのストレッカーアルデヒド分析。熟および熟成のマーカー(フルフラールおよびトランス-2-ノネナール)はサンプル対照として使用される。

熟成マーカー(新鮮ビール)	UF max	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
2-ME-Pr (ppb)	5	5	5	6
2-ME-Bu (ppb)	2	2	2	2
3-ME-Bu (ppb)	6	6	6	6
フルフラール(ppb)	10	11	11	10
メチオナール(ppb)	4	4	4	4
PheAcal (ppb)	6	6	6	7
T2N (ppb)	0.0011	0.005	0.004	0.006

40

【0310】

ストレッカーアルデヒド分析の前にトリアルビールを37℃で2週間インキュベートした。熟成ビールサンプルのデータは表20に与えられる。

【0311】

【表 2 3】

表20: 熟成ビールのストレッカーアルデヒド分析。熱および熟成のマーカー(フルフラールおよびトランス-2-ノネナール)はサンプル対照として使用される。

熟成マーカー(強制熟成ビール)	UF max	X3/BglS (a)	X3/BglS (b)	X3/BglS (a)
2-ME-Pr (ppb)	25	23	22	26
2-ME-Bu (ppb)	3	3	3	2
3-ME-Bu (ppb)	9	7	7	8
フルフラール(ppb)	111	92	93	78
メチオナール(ppb)	6	5	6	6
PheAcal (ppb)	10	9	9	10
T2N (ppb)	0.017	0.022	0.022	0.022

10

【0 3 1 2】

表 2 0 で与えられるデータは、ストレッカーアルデヒドレベルの予想される増大を示す。フルフラールおよびトランス-2-ノネナールの増大は予想レベルに達する。

【0 3 1 3】

結論：

パイロットスケール実験に基づいて、この実験で試験した B g l S および X 3 の比率は、パイロットスケール醸造において、良好に機能する、あるいはリファレンスの U l t r a F l o M a x よりもさらに良好に機能すると結論付けることができる。

20

【0 3 1 4】

3 0 0 m g / l β-グルカン含有麦芽と組み合わせて 2 2 % の大麦を含むという挑戦的な原材料の使用を鑑みて、結果は驚くべきものである。性能はマッシュ分離結果において見られるだけでなく、ビールろ過においても見られる。B R E W 2 (ペントサンデータ)を使用する場合に細胞壁材料の低可溶化のために、味の悪さおよび安定性に関連する品質の問題を引き起こし得る細胞壁材料をより低度で記録することができる。

【0 3 1 5】

最後に、X 3 / B g l s (b) 中のキシラナーゼ成分の用量の 2 0 % の増大は、評価されるパラメータのいずれかに影響を与えないと思われ、これにより X 3 / B g l s (a) はロバストな酵素組み合わせであることが示されると結論付けることができる。

30

【0 3 1 6】

配列：

A t u X y n 3、アスペルギルス・ツビゲンシス (A s p e r g i l l u s t u b i g e n s i s) (配列番号 1)、3 0 2 a a
 Q A S V S I D T K F K A H G K K Y L G N I G D Q Y T L T K N S K T P A I I K A D
 F G A L T P E N S M K W D A T E P S R G Q F S F S G S D Y L V N F A Q S N N K L
 I R G H T L V W H S Q L P S W V Q A I T D K N T L I E V M K N H I T T V M Q H Y
 K G K I Y A W D V V N E I F N E D G S L R D S V F Y Q V I G E D Y V R I A F E T
 A R A A D P N A K L Y I N D Y N L D S A S Y P K L T G M V S H V K K W I E A G I
 P I D G I G S Q T H L S A G G G A G I S G A L N A L A G A G T K E I A V T E L D
 I A G A S S T D Y V E V V E A C L D Q P K C I G I T V W G V A D P D S W R S S S
 T P L L F D S N Y N P K P A Y T A I A N A L

40

【0 3 1 7】

T e r X y n 1、ゲオスミチア・エメルソニ (G e o s m i t h i a e m e r s o n i i) (タラロミセス・エメルソニ (T a l e r o m y c e s e m e r s o n i i)) (配列番号 2)

A G L N T A A K A I G L K Y F G T A T D N P E L S D T A Y E T Q L N N T Q D F G
 Q L T P A N S M K W D A T E P E Q N V F T F S A G D Q I A N L A K A N G Q M L R
 C H N L V W Y N Q L P S W V T S G S W T N E T L L A A M K N H I T N V V T H Y K

50

GQCYAWD VVNEALNDDGTYRSNVFYQYIGEAYIPIAFATA
 AAADPN AKLYYNDYNI EYPGAKATAAQN LVKL VQSYGARI
 DGVGLQSHFIVGETPSTSSQQQNMAAFTALGVEVAITELD
 IRMQLPETEALLTQQATDYQSTVQACANTKGCVGITVWDW
 TDKYSWVPSTFSGYG DACPWDANYQKKPAYEGILTGLGQT
 VTSTTYIIISPTTSVGTGTTTSSGGSGGTTGVAQHWEQCGG
 LGWTGPTVCASGYTCTVINEYYSQCL

【0318】

AtuXyn4、アスペルギルス・ツビゲンシス (*Aspergillus tubi
 gensis*) (配列番号3)

10

EPIEPRQASVSIDTKFKAHGKKYLGNI GDQYT LTKNSKTP
 AIIKADFGALTPENSMKWDATEPSRGQFSFSGSDYLVNFA
 QSNKLI RGH TLVWHSQ LPSWVQSITDKNTLIEVMKNHIT
 TVMQHYKGIYAWD VVNEIFNEDGSLRDSVFYKVIGEDYV
 RIAFETARAADPN AKLYINDYNLDSASYPKLTGMVSHVKK
 WIAAGIPIDGIGSQTHLSAGGGAGISGALNALAGAGTKEI
 AVTELDIAGASSTDYVEVVEACLNQPKCIGITVWGVADPD
 SWRSSSTPLLFDSNYPKPAYTAIANAL

【0319】

AacXyn2、アスペルギルス・アキュリエタス (*Aspergillus acu
 leatus*) (配列番号4)

20

MVGLLSITAAALATVLPNI VSAVGLDQA AVAKGLQYFGTA
 TDNPELTDIPYVTQLNNTADFGQITPGNSMKWDATEPSQG
 TFTFTKGDVIADLAEGNGQYLRCHTLVWYNQLPSWVTS GT
 WTNATLTAALKNHITNVVSHYK GKCLHWDVVNEALNDDGT
 YRTNIFYTTIGEAYIPIAFAAAAAADPDAKLFYNDYNLEY
 GGAKAASARAIVQLVKNAGAKIDGVGLQAHFSVGTVPSTS
 SLVSVLQSFTALGVEVAYTEADVRI L LPTTATTLAQSSD
 FQALVQSCVQTTGCVGFTIWDWTDKYSWVPSTFSGYG AAL
 PWDENLVKKPAYNGLLAGMGVTVT TTTT TTTTATATGKTTT
 TTTGATSTGTTAAHWGQCGGLNWSGPTACATGYTCTYVND
 YYSQCL

30

【0320】

TreXyn3、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*)
 (配列番号5)

MKANVILCLLAPLVAAALPTETIHLDP ELAALRANLTERTA
 DLWDRQASQSIDQLIKRK GKLYFGTATDRGLLQREKNAAI
 IQADL GQVTPENSMKWQSLENNQGQLNWGDADYLVNFAQQ
 NGKSIRGH TL I WHSQ LPAWVNNINNADTLRQVIRTHVSTV
 VGRYKGI RAWD VVNEIFNEDGTLRSSVFSRLLGEEFVSI
 AFRAARDADPSARLYINDYNLDRANYGKVNGLKTYVSKWI
 SQGVPI DGI GSQSHLSGGGGSGT LGALQQLATVPVTE LAI
 TELDIQGAPT TDYTQVVQACLSVSKCVGITVWGISDKDSW
 RASTNPLLF DANFNPKPAYNSIVGILQ

40

【0321】

TreXyn5、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*)
 (配列番号6)

QC IQPGTGYNNGYFYSYWNDGHGGV TYCNGPGGQFSVNWS
 NSGNFVGGKGWQPGTKNRVINFSGSYNPNNGNSYLSVYGWS
 RNPLIEYYIVENFGTYNPSTGATKLG EVTSDGSVYDIYRT

50

Q R V N Q P S I I G T A T F Y Q Y W S V R R N H R S S G S V N T A N H F N A W A
Q Q G L T L G T M D Y Q I V A V E G Y F S S G S A S I T V S D

【0322】

B s u G l u S、バチルス・スブチリス (B a c i l l u s s u b t i l i s) (配
列番号7)、214aa

Q T G G S F F D P F N G Y N S G F W Q K A D G Y S N G N M F N C T W R A N N V S
M T S L G E M R L A L T S P A Y N K F D C G E N R S V Q T Y G Y G L Y E V R M K
P A K N T G I V S S F F T Y T G P T D G T P W D E I D I E F L G K D T T K V Q F
N Y Y T N G A G N H E K I V D L G F D A A N A Y H T Y A F D W Q P N S I K W Y V
D G Q L K H T A T N Q I P T T P G K I M M N L W N G T G V D E W L G S Y N G V N
P L Y A H Y D W V R Y T K K

10

【0323】

T e r G l u 1、ゲオスミチア・エメルソニ (G e o s m i t h i a e m e r s o n
i i) (タラロミセス・エメルソニ (T a l e r o m y c e s e m e r s o n i i))
(配列番号8)

A P V K E K G I K K R A S P F Q W F G S N E S G A E F G N N N I P G V E G T D Y
T F P N T S A I Q I L I D Q G M N I F R V P F L M E R M V P N Q M T G P V D S A
Y F Q G Y S Q V I N Y I T S H G A S A V I D P H N F G R Y Y N N I I S S P S D F
Q T F W H T I A S N F A D N D N V I F D T N N E Y H D M D E S L V V Q L N Q A A
I D G I R A A G A T S Q Y I F V E G N S W T G A W T W T Q V N D A M A N L T D P
Q N K I V Y E M H Q Y L D S D G S G T S D Q C V N S T I G Q D R V E S A T A W L
K Q N G K K A I L G E Y A G G A N S V C E T A V T G M L D Y L A N N T D V W T G
A I W W A A G P W W G D Y I F S M E P P S G I A Y E Q V L P L L Q P Y L

20

【0324】

B s u G l u 1 0 3 F U L L、バチルス・スブチリス (B a c i l l u s s u b t i
l i s) (配列番号9)

D D Y S V V E E H G Q L S I S N G E L V N E R G E Q V Q L K G M S S H G L Q W Y
G Q F V N Y E S M K W L R D D W G I T V F R A A M Y T S S G G Y I D D P S V K E
K V K E T V E A A I D L G I Y V I I D W H I L S D N D P N I Y K E E A K D F F D
E M S E L Y G D Y P N V I Y E I A N E P N G S D V T W D N Q I K P Y A E E V I P
V I R D N D P N N I V I V G T G T W S Q D V H H A A D N Q L A D P N V M Y A F H
F Y A G T H G Q N L R D Q V D Y A L D Q G A A I F V S E W G T S A A T G D G G V
F L D E A Q V W I D F M D E R N L S W A N W S L T H K D E S S A A L M P G A N P
T G G W T E A E L S P S G T F V R E K I R E S A S I P P S D P T P P S D P G E P
D P G E P D P T P P S D P G E Y P A W D S N Q I Y T N E I V Y H N G Q L W Q A K
W W T Q N Q E P G D P Y G P W E P L K S D P D S G E P D P T P P S D P G E Y P A
W D S N Q I Y T N E I V Y H N G Q L W Q A K W W T Q N Q E P G D P Y G P W E P L
N

30

【0325】

T r e G l u 2、トリコデルマ・リーゼイ (T r i c h o d e r m a r e e s e i)
(配列番号10)

40

Q Q T V W G Q C G G I G W S G P T N C A P G S A C S T L N P Y Y A Q C I P G A T
T I T T S T R P P S G P T T T T R A T S T S S S T P P T S S G V R F A G V N I A
G F D F G C T T D G T C V T S K V Y P P L K N F T G S N N Y P D G I G Q M Q H F
V N D D G M T I F R L P V G W Q Y L V N N N L G G N L D S T S I S K Y D Q L V Q
G C L S L G A Y C I V D I H N Y A R W N G G I I G Q G G P T N A Q F T S L W S Q
L A S K Y A S Q S R V W F G I M N E P H D V N I N T W A A T V Q E V V T A I R N
A G A T S Q F I S L P G N D W Q S A G A F I S D G S A A A L S Q V T N P D G S T
T N L I F D V H K Y L D S D N S G T H A E C T T N N I D G A F S P L A T W L R Q
N N R Q A I L T E T G G G N V Q S C I Q D M C Q Q I Q Y L N Q N S D V Y L G Y V

50

GWGAGSFDSTYVLTETPTGSGNSWTDTSLVSSCLARK

【0326】

TreGl u3、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*)
(配列番号11)

QTSCDQWATFTGNGYTVSNNLWGASAGSGFGCVTAVSLSG
GASWHADWQWSGGQNNVKSYQNSQIAIPQKRTVNSISSMP
TTASWSYSGSNIRANVAYDLFTAANPNHVTYSGDYELMIW
LGKYGDIGPIGSSQGTVNVGGQSWTLYYGYNGAMQVYSFV
AQTNNTNYSGDVKNFFNYLRDNKGYNAAGQYVLSYQFGTE
PFTGSGTLNVASWTASIN

10

【0327】

TreGl u4、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*)
(配列番号12)

HGHINDIVINGVWYQAYDPTTFPYESNPPIVVGWTAADLD
NGFVSPDAYQNPDIICHKNATNAKGHASVKAGDTILFQWV
PVPWPHPGPIVDYLANCNGDCETVDKTTLEFFKIDGVGLL
SGGDPGTWASDVLISNNNTWVVKIPDNLAPGNYVLRHEII
ALHSAGQANGAQNYPQCFNIAVSGSGSLQPSGVLGTDLYH
ATDPGVLINITYTSPLNYYIIPGPTVVSGLP TSVAQGS SAAT
ATASATVPGGGSGPTSRTTTTARTTQASSRPSSTPPATTS
APAGGPTQTLYGQCGGSGYSGPTRCAPPATCSTNPYYAQC
LN

20

【0328】

TreGl u6、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*)
(配列番号13)

AFSWKNVKLGGGGGFVPGIIFHPKTKGVAYARTDIGGLYR
LNADDSWTAVTDG IADNAGWHNWGIDAVALDPQDDQKVYA
AVGMYTNSWDPSNGAIIRSSDRGATWSFTNLPFKVGGNMP
GRGAGERLAVDPANSNIIFYFGARSGNGLWKSTDGGVTFSK
VSSFTATGTYIPDPSDSNGYNSDKQGLMWVTFDSTSSTTG
GATSRI FVGTA DNITASVYVSTNAGSTWSAVPGQPGKYFP
HKAKLQPAEKALYLYTYSWWPDAQLFRSTD SGT TWSP I WAW
ASYPTETYYYSISTPKAPWIKNNFIDVTSESPSDGLIKRL
GWMIESLEIDPTDSNHWLYGTGMTIFGGHDLTNWDTRHN
VSIQSLADGIEEFVQDLASAPGGSEL LA AVGDDNGFTFAS
RNDLGTSPQTVWATPTWATSTSVDYAGNSVKSVVRVGNTA
GTQQVAISSDGGATWSIDYAADTSMNGGTVAYSADGDTIL
WSTASSGVQRSQFQGSFASVSSLPAGAVIASDKKTNSV
FYAGSGSTFYVSKDTGSSFTTRGPKLGSAGTIRDIAAHPTTAG
TLYVSTDVGIFRSTD SGTTFGQVSTALTNTYQIALGVGSG
SNWNLYAFGTGPSGARLYASGDSGASWTDIQGSQGF
GSIDSTKVAGSGSTAGQVYVGTNGRGVFYAQT
VGGGTGGTSSSTKQSSSSTSSASSSTTLRSSV
VSTTRASTVTS SR TSSAAGPTGSGVAGHYAQC
GGIGWTGPTQCVAPYVCQKQNDY Y Y QCV

30

40

【0329】

TreGl u7、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*)
(配列番号14)

HGQVQNFTINGQYNQGFILDYYYQKQNTGHFPNVAGWYAE
DLDLGFISPDQYTTTPDIVCHKNAAPGAISATAAAGSNIVF

50

QWGP GVWPHPYGP I VTYVVECSGSC TTVNKNNLRWVKIQE
AGINYN TQVWAQQDLINQGNKWTVKIPSSLRPGNYVFRHE
LLAAHGASSANGMQNYPQCVNIAVTGSGTKALPAGTPATQ
LYKPTDPGILFNPTTITSYTIPGPALWQG

【0330】

TreGl u8、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*)
(配列番号15)

GKIKYLGVAIPGIDFGCDIDGSCPTDTS SVPLLSYKGGDG
AGQMKHFAEDDGLNVFRISATWQFVLNNTVDGKLDDELNWG
SYNKVVNACLETGAYCMIDMHNFA RYNGGIIGQGGVSDDI
FVDLWVQIAKYYEDNDKII FGLMNEPHDLDIEIWAQTCQK
VVTAIRKAGATSQMILLPGTNFASVETYVSTGSAEALGKI
TNPDGSTDLLYFDVHKYLDINN S GSHAECTTDNVDAFNDF
ADWLRQNKRQAI ISETGASMEPSCMTAFCAQNKAISENSD
VYIGFVGWGAGSFDTSYILTLTPLGKPGNYTDNKL MNECI
LDQFTLDEKYRPTPTSISTAAEETATATATSDGDAPSTTK
PIFREETASPTPNAVTKPSPDTS DSSDDDKDSAASMSAQG
LTGTVLFTVAALGYMLVAF

【0331】

BsuGl uC CBD、バチルス・スブチリス (*Bacillus subtilis*)
(配列番号16)

MKRSISIFITCLLITLLTMGGMIAS PASAAGTKTPVAKNG
QLSIKGTQLVNRD GKAVQLKGIS SHGLQWYGEYVNKDSLK
WLRDDWGITVFRAAMYTADGGYIDNPSVKNKVKEAVEAAK
ELGIYVIIDWHILNDGNPNQNK EKAKEFFKEMSSLYGNTP
NVIYEIANEPNGDVNWKRDIKPYAE EVISVIRKNDPDNI I
IVGTGTWSQDVNDAAADDQLKDANVMYALH FYAGTHGQFLR
DKANYALSKGAPIFVTEWGTSDAS GNGGVFLDQSREWLKY
LDSKTI SWVNWNLS DKQESS SALKPGASKTGGWRLSDLSA
SGTFVRENILGTKDSTKDI PETPSKDKPTQENGISVQYRA
GDGSMNSNQIRPQLQIKNNGNTTVDLKDVTARYWYKAKNK
GQNFD CDYAQIGCGNVTHKFVTLHKPKQGADTYLELGFKN
GTLAPGASTGNIQLRLHND DWSNYAQSGDYSFFKSNTFKT
TKKITLYDQGKLIWGTEPN

【0332】

BsuXyn3、バチルス・スブチリス (*Bacillus subtilis*) キシ
ラナーゼ変異体 (配列番号17)

ASTDYWQNWTFGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGK
GWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLIEYY
VVD SWGTYRPTGTYKGT VKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDG
DDTTFTTQYWSVRQSKRPTGSNATITFSNHVN AWKSHGMNL
GSNWAYQVMATEGYQSSGSSSNVT VW

【0333】

BsuXyn4、バチルス・スブチリス (*Bacillus subtilis*) キシ
ラナーゼ変異体 (配列番号18)

ASTDYWQNWT DGYGIVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGK
GWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLIEYY
VVD SWGTYRPTGTYKGT VYSDGGWYDIYTATRDNAPSIDG
DFTTFTTQYWSVRQSKRPTGSNATITFSNHVN AWRSHGMDL
GSNWAYQVMATEGYLSSGSSSNVT VW

10

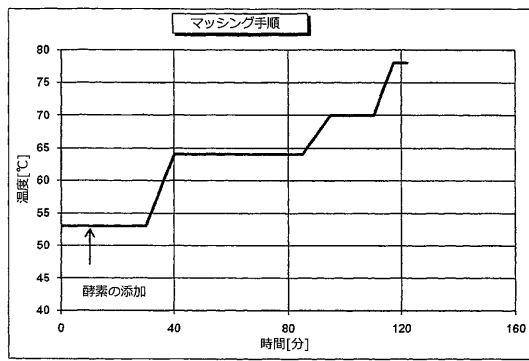
20

30

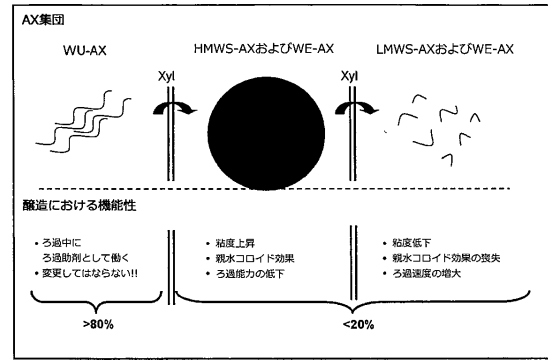
40

50

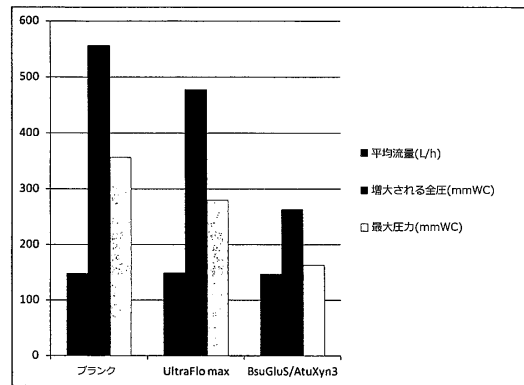
【図 1】



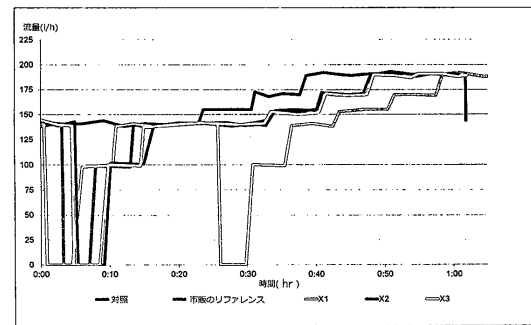
【図 3】



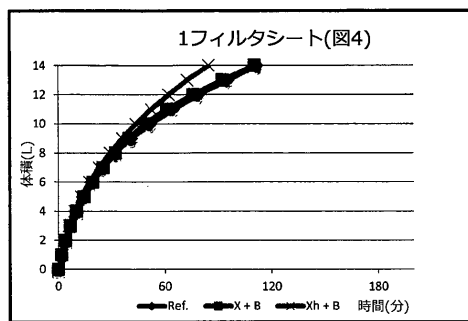
【図 2】



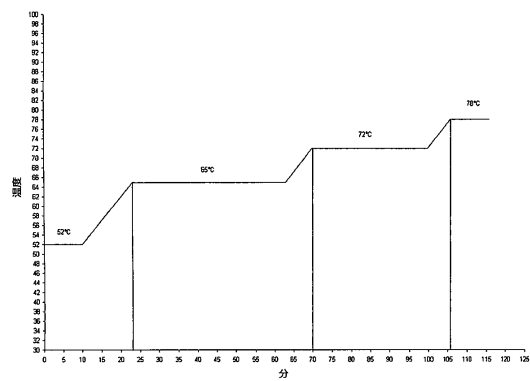
【図 4】



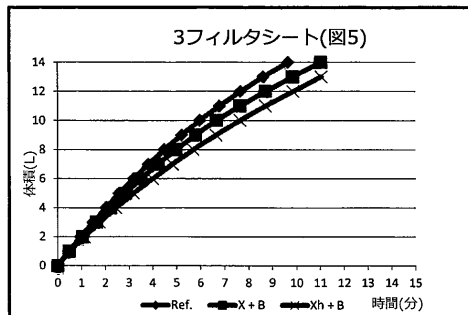
【図 5】



【図 7】



【図 6】



【配列表】

0006084617000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 C	7/16	(2006.01)	C 1 2 C	7/16	
C 1 2 G	3/00	(2006.01)	C 1 2 G	3/00	
C 1 2 G	1/00	(2006.01)	C 1 2 G	1/00	
A 2 3 L	2/38	(2006.01)	A 2 3 L	2/38	J

(31)優先権主張番号 61/676,535

(32)優先日 平成24年7月27日(2012.7.27)

(33)優先権主張国 米国(US)

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 国際公開第2005/059084 (WO, A1)

国際公開第2009/108941 (WO, A2)

Biosci. Biotechnol. Biochem., 1992年, vol.56, no.6, pp.906-912

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00-15/90

C 1 2 N 9/00-9/99

UniProt/GeneSeq

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/

WPIDS (STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

PubMed