

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 090**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/00** (2006.01)

**C12N 9/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA  
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2006 PCT/DK2006/000214**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.11.2006 WO06114095**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2006 E 06722906 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **28.10.2020 EP 1877568**

54 Título: **Hidrólisis de arabinoxilano**

30 Prioridad:

**26.04.2005 DK 200500609**

**10.11.2005 DK 200501562**

**18.11.2005 DK 200501612**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:  
**15.06.2021**

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)  
Krogshøjvej 36  
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**SOERENSEN, HANNE RISBJERG;  
PEDERSEN, SVEN;  
VIKSOE-NIELSEN, ANDERS;  
JOERGENSEN, CHRISTEL THEA;  
CHRISTENSEN, LARS HYLLING;  
JOERGENSEN, CHRISTIAN ISAK;  
HANSEN, CARSTEN HOERSLEV y  
KOFOD, LENE VENKE**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 393 090 T5

## DESCRIPCIÓN

Hidrólisis de arabinoxilano

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a un proceso para hidrólisis enzimática de arabinoxilano, y una composición enzimática adecuada para el uso en tal proceso.

10 **Antecedentes de la invención**

[0002] Arabinoxilano, un polisacárido compuesto por xilosa y arabinosa, es parte de la fibra insoluble y soluble en agua presente en cereales, en particular en las membranas celulares. La hidrólisis de arabinoxilano es un requisito importante para una utilización mejorada de la hemicelulosa del cereal, por ejemplo en la industria de fermentación de etanol y otras industrias a base de cereales.

[0003] Arabinoxilano consiste en residuos de alfa-L-arabinofuranosa unidos como puntos de ramificación a un esqueleto polimérico de xilosa beta-(1-4)-unido. Los residuos de xilosa pueden estar mono-sustituídos en la posición C2 o C3 o di-sustituídos en ambas posiciones C2 y C3. Además, ácido ferúlico y ácido p-cumárico puede ser enlazado covalentemente a arabinoxilano vía esterificación a la posición C5 de algunas de las unidades de arabinosilo. Estas sustituciones en el esqueleto de xilano retardan las acciones de xilanasas y la hidrólisis completa de arabinoxilano así requiere ambas actividades de escisión y despolimerizantes de grupo lateral. Los productos principales de hidrólisis de arabinoxilano son los azúcares C5 xilosa y arabinosa.

[0004] Un proceso para hidrólisis de arabinoxilano usando interacciones sinérgicas entre enzimas presentes en composiciones comerciales enzimáticas de *Humicola insolens* y *Trichoderma reesei* ha sido descrito previamente por los presentes inventores en Sorensen, H.R. et al. (Biotechnology and Bioengineering, Vol. 81, No. 6, 20 March, 726-731, 2003) y Sorensen, H.R. et al. Enzyme and Microbial Technology, Vol. 36, No. 5-6, 1 April 2005, 773-784). Hidrólisis catalizada de enzima de > 50% de la parte soluble del arabinoxilano de endospermo de trigo podría ser conseguida, pero sólo rendimientos de monosacáridos bajos fueron obtenidos con tratamientos enzimáticos similares en el arabinoxilano de trigo insoluble. No obstante, ya que las actividades enzimáticas de degradación de arabinoxilano están presentes como actividades secundarias en preparaciones comerciales con otras actividades enzimáticas como su actividad principal, niveles de dosificación altos de 5 - 10 % en peso de la preparación enzimática por peso del sustrato se tiene que añadir para obtener una hidrólisis eficaz. Tales altos niveles de adición enzimáticos no son realizables para el uso en aplicaciones de producción de escala completa y procesos mejorados para hidrólisis de arabinoxilano son por tanto necesitados.

**Resumen de la invención**

[0005] Los inventores han encontrado ahora procesos mejorados para hidrólisis de arabinoxilano y una composición enzimática adecuada para el uso en tal proceso. En un proceso divulgado en el presente documento, un sustrato con arabinoxilano se contacta con una enzima con actividad hacia xilosas di-sustituídas, como por ejemplo una alfa-L-arabinofuranosidasa de la familia de glucósido hidrolasas 43 (GH43), y una enzima con actividad hacia xilosas mono-sustituídas en la posición C2 o C3, por ejemplo tal como una alfa-L-arabinofuranosidasa de glucósido hidrolasa familia 51, 54 o 62 (GH51, GH54 o GH62).

[0006] Por consiguiente la invención proporciona en un primer aspecto un proceso que comprende poner en contacto un sustrato con arabinoxilano, con una composición que comprende, a) una alfa-L-arabinofuranosidasa de GH43, con actividad hacia xilosas di-sustituídas, b) una alfa-L-arabinofuranosidasa de GH51, GH54 o GH62 con actividad hacia xilosas mono-sustituídas en la posición C2 o C3, y c) hidrolizar arabinoxilano, donde la alfa-L-arabinofuranosidasa de GH43 tiene al menos 85% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrados como aminoácidos 19-558 de SEC ID n°: 1 y está presente en una cantidad de al menos 5% p/p de proteína enzimática total presente en la composición.

[0007] La invención proporciona en un segundo aspecto una composición para hidrólisis de arabinoxilano de dicha composición que comprende las actividades enzimáticas; a) una alfa-L-arabinofuranosidasa de GH43 con actividad hacia xilosas di-sustituídas, y, b) una alfa-L-arabinofuranosidasa de GH51, GH54 o GH62 con actividad hacia xilosas mono-sustituídas en la posición C2 o C3, donde la alfa-L-arabinofuranosidasa de GH43 tiene al menos 85% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada como aminoácidos 19-558 de la SEC ID n°: 1 y está presente en una cantidad de al menos 5% p/p de proteína enzimática total presente en la composición.

[0008] La invención también proporciona un proceso tal como se define en la reivindicación 12 adjunta. La invención proporciona en otros aspectos usos de la composición del segundo aspecto para tratamiento de un sustrato con arabinoxilano.

65

**Breve descripción del dibujo**

[0009]

Fig. 1A-C muestran polímeros de arabinoxilano:

Fig. 1A muestra arabinoxilano intacto. Residuos de arabinofuranosilo enlazados alfa(1→3) (mono-sustituidos) y alfa(1→2) y alfa(1→3) (di-sustituidos) a xilosas internas.

Fig. 1B muestra arabinoxilano di-sustituido. Residuos de arabinofuranosilo enlazados alfa(1→2) y alfa(1→3) (di-sustituido) a xilosas internas.

Fig. 1C muestra arabinoxilano individualmente sustituido. Residuos de arabinofuranosilo enlazados alfa(1→2) y alfa(1→3) (mono-sustituidos) a xilosas internas

Fig. 2A-C muestran oligosacáridos de arabinoxilano:

Fig. 2A muestra grupos de arabinosilo enlazados a C-3 interno. Residuos de arabinofuranosilo enlazados alfa(1→3) (mono-sustituidos) y alfa(1→2) y alfa(1→3) (di-sustituidos) a xilosas internas.

Fig. 2B muestra grupos de arabinosilo enlazados a C-3 terminal. Residuos de arabinofuranosilo enlazado alfa(1→3) (mono-sustituidos) a xilosas terminales y alfa(1→2) y alfa(1→3) (di-sustituidos) a xilosas internas

Fig. 2C muestra grupos de arabinosilo enlazados a C-2 interno. Residuos de arabinofuranosilo enlazado alfa(1→2) y alfa(1→3)(mono-sustituidos) a xilosas internas

**Descripción detallada de la invención**

[0010] En la descripción y reivindicaciones que sigue lo siguiente hay definiciones de algunos de los términos técnicos que son empleados.

[0011] La numeración de familias de glucósido hidrolasa aplicada en esta descripción sigue el concepto de Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) CAZy - Carbohydrate-Active Enzymes server en URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html> o alternativamente Coutinho, P.M. & Henrissat, B. 1999; The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. En "Genetics, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation", K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita and T. Kimura eds., Uni Publishers Co., Tokyo, pp. 15-23, and Bourne, Y. & Henrissat, B. 2001; Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules, Current Opinion in Structural Biology 11:593-600.

[0012] El término "almidón granulado" en el contexto de la presente invención se entiende como almidón crudo no cocido, es decir almidón que no ha sido sometido a una gelatinización.

[0013] El término "biomasa" significa en el contexto de la presente invención todos los materiales con hemicelulosa. Biomasa es un recurso muy heterogéneo y químicamente complejo que comprende subproductos de procesamiento industrial y agrícola de todos los tipos de material vegetal. La biomasa puede ser cualquier materia orgánica derivada de plantas que incluye brotes herbáceos de cultivos energéticos leñosos, cultivos alimentarios y forrajeros y cultivos agrícolas desechos y residuos tal como paja, tallos, hojas, salvado de maíz, cáscaras, mazorcas, cortezas, cubiertas, y vainas, desechos de madera tal como corteza, virutas, serrín, pulpa de madera y licor de pulpa. La biomasa puede incluir biomasa de desechos, tal como desechos de papel, cartón, desecho de madera de construcción y de demolición. La biomasa puede también incluir lodo o sólidos recuperados de tratamiento de agua de desecho industrial o municipal al igual que de abono animal.

[0014] El "sustrato con arabinoxilano" a ser tratado en el proceso de la presente invención se puede obtener de cualquier fuente vegetal, en particular ser obtenido de tubérculos, raíces, tallos, leguminosas, cereales o grano entero. Preferidos son hemicelulosa con productos de desechos agrícolas (es decir residuos y/o subproductos) tal como cáscaras de mandioca, vainas de cacao, cáscaras de arroz y/o cascotes, salvado de arroz de pulido de arroz, mazorcas, paja, cascotes y/o cáscaras de grano de cereal, tallo de caña de azúcar prensado, pulpa de remolacha azucarera, pulpa de semilla de algarroba u otro vegetal o pulpas de fruta. El sustrato puede ser cualquier biomasa.

[0015] Preferido es un sustrato obtenido de grano de cereal, por ejemplo tal como grano molido o subproductos de procesamiento de grano de cereal, por ejemplo un arabinoxilano con subproducto de molido en húmedo o en seco de cereal, el grano de cereal puede ser cualquier grano de cereal aunque preferido es un grano de cereal seleccionado del grupo que consiste en grano (maíz), trigo, cebada, avena, arroz, sorgo y mijo. Los más preferidos para la presente invención es un sustrato con arabinoxilano derivado de trigo.

[0016] El sustrato con arabinoxilano puede ser la molienda o trituración de un proceso de fabricación de cerveza y/o de fermentación, o puede ser un subproducto de un proceso de fabricación de cerveza y/o de fermentación,

por ejemplo grano de destilación en seco o en húmedo, grano consumido, vinaza, bagazo etc.

[0017] Sustratos con arabinoxilano normalmente comprenden tanto arabinoxilano soluble en agua e insoluble de agua.

5 Contemplado para los aspectos de la presente invención es sustratos que comprenden tanto arabinoxilano soluble en agua y/o arabinoxilano insoluble en agua.

#### Procesos

10 [0018] El proceso donde un sustrato con arabinoxilano se contacta con actividades enzimáticas que comprenden una enzima con actividad hacia xilosas di-sustituidas, y una enzima con actividad hacia xilosas mono-sustituidas en la posición C2 o C3 es particularmente adecuado para la producción de polímeros de xilosa lineales (homopolímero de xilano) con pocos o ningunos grupos laterales de arabinosa. La enzima con actividad hacia xilosas di-sustituidas es una alfa-L-arabinofuranosidasa de GH43, y una enzima con actividad hacia xilosas mono-sustituidas en la posición C2 o C3 es un alfa-L- arabinofuranosidasa de GH51, GH54 o/o GH62, más preferiblemente un GH51.

15 [0019] Cuando las dos arabinofuranosidasas se agregan a una solución de arabinoxilano los productos resultantes serán polímeros de xilosa lineales de peso molecular alto y moléculas de arabinosa. Esto permitirá una separación fácil del polímero de xilosa lineal por técnicas conocidas (ultrafiltración o precipitación de solvente del xilano en una solución de etanol) de arabinosa.

20 [0020] Los polímeros de xilosa lineales pueden ser adicionalmente parcialmente digeridos con actividades enzimáticas, tal como una beta-xilosidasa, y/o una endo-1,4-beta-xilanasa, para producir xilo-oligosacáridos, que también tienen aplicaciones dietéticas. Preferiblemente la beta-xilosidasa es una beta-xilosidasa de GH3, y/o preferiblemente la endo-1,4-beta xilanasa es una endo-1,4- betaxilanasa de GH10 o GH11.

25 [0021] Cuando una endo-1,4-beta-xilanasa se adiciona a los polímeros de xilosa purificados lineales (purificado como se ha descrito anteriormente) los productos resultantes serán xilo-oligosacáridos esencialmente libres de grupos laterales de arabinosa. El tamaño de los oligosacáridos se puede controlar por la dosis de la endo-1,4-beta-xilanasa al igual que por la longitud del tiempo de reacción.

30 [0022] Cuando tanto una endo-1,4-beta-xilanasa y una beta-xilosidasa se agregan a los polímeros de xilosa purificados lineales el producto resultante será xilosa.

35 [0023] Así la descripción proporciona un proceso para obtener un producto de polímero de xilosa lineal esencialmente libre de sustituyentes de arabinosa, un proceso para obtener un producto de xilo-oligosacárido esencialmente libre de grupos laterales de arabinosa y un proceso para separar xilosa y arabinosa en una vía más simple que la tecnología precedente (cromatografía de intercambio iónico).

40 [0024] Además la invención proporciona un producto de polímero de xilosa lineal de alto peso molecular y esencialmente libre de grupos laterales de arabinosa y un producto de xilo-oligosacárido esencialmente libre de grupos laterales de arabinosa.

45 [0025] Preferiblemente el producto de polímero de xilosa lineal o producto de xilo-oligosacárido comprende al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, tal como al menos 98% de polímero en peso del producto, polímero que tiene un grado de polimerización de al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 120 al menos 150, al menos 200, al menos 300, al menos 500, al menos 1000, al menos 2000, al menos 5000, o al menos 10000.

50 [0026] Preferiblemente el producto de polímero de xilosa lineal o producto de xilo-oligosacárido que comprende al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 90%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, tal como al menos 98% de polímero en peso del producto cuyo polímero tiene un grado de polimerización inferior a 5000, menos que 2500, menos que 1500, menos que 1000, menos que 500, menos que 100, menos que 75, menos que 50, menos que 25, menos que 10, menos que 9, menos que 8, menos que 7, menos que 6, menos que 5, y preferiblemente menos que 4.

55 [0027] Preferiblemente el producto de polímero de xilosa lineal o producto de xilo-oligosacárido comprende al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 90%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, tal como al menos 98% de polímero en peso del producto cuyo polímero tiene un grado de polimerización seleccionado del grupo que consiste en los intervalos de 3 a 10, de 11 a 25, de 26 a 50, de 51 a 100, de 101 a 200, de 201 a 500, de 501 a 1000, de 1001 a 5000, y de 5001 a 10000.

60 [0028] Los polímeros de xilosa lineales producidos se pueden utilizar como un aditivo alimenticio, por ejemplo

como un agente de carga, un sustituto de grasa de caloría baja o fibra dietética, tal como una fibra dietética no soluble. Aplicaciones por ejemplo estarán en pasteles, snacks extruidos, otros productos de cereal, y confitería. Aplicaciones técnicas incluirán aditivo para papel y productos de pulpa, materiales plásticos (películas), donde plastificantes pueden ser añadidos, y como un agente de encolado.

5

[0029] El producto de xilo-oligosacárido tendrá aplicaciones como fibras dietéticas, tal como fibras dietéticas solubles. Estas fibras dietéticas se pueden utilizar para aumentar la cantidad de bacterias bifidus en el intestino inferior. Aplicaciones serán por ejemplo en yogur, helado, y refrescos.

10

[0030] Una forma de realización, donde actividades enzimáticas adicionales están presentes, tal como una beta-xilosidasa de GH3, y/o una endo-1,4-beta-xilanasas de GH10 es particularmente útil cuando hidrólisis más completa de arabinoxilano es deseada. Además de liberación azúcares C5 la hidrólisis de arabinoxilano también hace polímeros de glucosa asociados como almidón y celulasa más accesibles para la acción de las enzimas apropiadas. Esto es particularmente útil cuando la degradación de sustratos complejos son requeridos, por ejemplo en la elaboración o en la hidrólisis de almidón o biomasa para la producción de etanol de combustible, o en composición de pienso para animales.

15

[0031] Xilosa y/o arabinosa liberadas durante la hidrólisis enzimática de arabinoxilano en el proceso de la invención se pueden utilizar como una fuente de xilosa y/o arabinosa como tal, o como materia prima para síntesis química/enzimática o procesos de fermentación, por ejemplo para la producción de xilitol, ácido xilárico, ácidos xilónicos, ácido arabónico, ácido arabinico, 2,3-butanodiol, ácido láctico, ácido lactónico, furanos y/o etanol.

20

[0032] Para la degradación de incluso más sustratos complejos, o donde una degradación más completa es requerida, se puede desear la presencia de incluso actividades enzimáticas adicionales. En una forma de realización preferida la/s actividad/es enzimática/s además comprende/n una acetil xilano esterasa (EC 3.1.1.72) y/o una feruloil esterasa (EC 3.1.1.73) y/o una alfa-glucuronidasa (EC 3.2.1.139).

25

[0033] En una forma de realización del proceso del primer aspecto la/s actividad/es enzimática/s además comprende/n una enzima seleccionada de la lista que consiste en una esterasa de acetil xilano, una feruloil esterasa, una alfa-amilasa, una glucoamilasa, una fitasa y una proteasa.

30

[0034] En la elaboración y otros procesos de fermentación basados en molienda de cereal arabinoxilanos pueden ser extraídos de membranas celulares con agua caliente y pueden formar soluciones de alta viscosidad. Si en los procesos de elaboración se usan maltas que no están adecuadamente modificadas durante malteado, extractos de malta pueden contener niveles altos de arabinoxilanos y otros polisacáridos causando un aumento en la viscosidad de los extractos. Las dificultades asociadas a la filtración de tales extractos pueden significativamente atrasar el proceso de elaboración. En una forma de realización de la presente invención el sustrato con arabinoxilano para ser contactado con la composición de la invención es una mezcla de un proceso de elaboración de cerveza, por el cual por ejemplo la viscosidad de la mezcla es reducida y/o se liberan polisacáridos adicionales.

35

40

[0035] En una forma de realización de la presente invención el proceso es cualquier proceso de etanol, basado en hidrólisis enzimática de almidón gelatinizado o granulado, por ejemplo en almidón granulado como se describe en WO2004080923 o WO2004081193. Contactando la mezcla con la composición de la invención se puede reducir la viscosidad de la mezcla. También polisacáridos adicionales pueden ser liberados, no sólo como azúcares C5 pero también como glucosa cuando la descomposición de arabinoxilano deja el almidón más accesible a enzimas amilolíticas normalmente presentes durante los procesos de este tipo. Una enzima adicional que ventajosamente se puede aplicar en un proceso de etanol a base de almidón es una enzima seleccionada de la lista que consiste en beta-glucanasa, alfa-amilasa, glucoamilasa, CGTasa, fitasa y proteasa.

45

50

[0036] El proceso de la presente invención puede ser cualquier proceso de etanol, que comprende hidrólisis enzimática de biomasa y/o efluente de pretratamiento de biomasa. Una enzima adicional que ventajosamente se puede aplicar en un proceso de etanol basado en biomasa es una enzima seleccionada de la lista que consiste en beta-glucanasa, celulasa, celobiohidrolasa, y beta-glucosidasa.

55

[0037] En un proceso de fermentación el hidrolizado de arabinoxilano puede ventajosamente ser contactado con un organismo de levadura u otro organismo de fermentación capaz de utilizar azúcares C5. Alternativamente, el hidrolizado de arabinoxilano se puede contactar con una xilosa isomerasa (EC 5.3.1.5) para isomerización de xilosa en xilulosa que es fermentable a etanol usando levadura *Saccharomyces*.

60

[0038] La composición de la invención puede también ser usada en el procesamiento de una materia prima de cereal destinada para uso como un producto de pienso/alimento o la composición se puede aplicar como un aditivo de pienso/alimento. Tales aditivos de pienso/alimento basados en enzima se pueden incorporar en un producto de pienso/alimento a base de cereales que incluye uno o más de trigo, cebada, triticale, centeno, arroz y maíz. El aditivo de pienso/alimento tiene la ventaja de mejorar la relación de conversión de pienso/alimento y/o aumentar la digestibilidad del producto de pienso/alimento a base de cereales en el que es incluido. La composición de la invención usada como aditivo de pienso/alimento puede preferiblemente ser usada junto con una fitasa.

65

[0039] La presente divulgación además se refiere a composición para tratar un sustrato con arabinoxilano, dicha composición comprendiendo una enzima con actividad hacia xilosas di-sustituidas, por ejemplo tal como una alfa-L-arabinofuranosidasa de GH43, y una enzima con actividad hacia xilosas sustituidas en la posición C2 o C3, por ejemplo tal como una alfa-L-arabinofuranosidasa de GH51, GH54 o GH62.

[0040] La presente divulgación además se refiere a composiciones que comprenden una alfa-L-arabinofuranosidasa de GH43, una alfa-L-arabinofuranosidasa de GH51, GH54 o GH62, una beta-xilosidasa, y/o una endo-1,4-beta-xilanasas al igual que a una composición que comprende las actividades mencionadas y una enzima seleccionada del grupo que consiste en alfa-amilasa, CGTasa, glucoamilasa, fitasa, proteasa, beta-glucanasa, celulasa, celobiohidrolasa, y/o beta-glicosidasa.

[0041] La composición puede comprender alfa-L-arabinofuranosidasa de GH43 en una cantidad de al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 70%, o incluso al menos 80% p/p de proteína enzimática de arabinofuranosidasa total presente en la composición. Más preferiblemente la composición puede comprender alfa-L-arabinofuranosidasa de GH43 en una cantidad de al menos 5%, tal como al menos 10% al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 70% p/p de proteína enzimática total presente en la composición.

[0042] La composición se puede utilizar para tratamiento de un sustrato con arabinoxilano, por ejemplo en un proceso de fermentación, por ejemplo para reducción de viscosidad de un lodo y/o solución que comprende un sustrato con arabinoxilano. La composición se puede utilizar para producir un producto de pienso/alimento, por ejemplo para producir o modificar una fibra nutritiva/dietética y/o para producir una xilosa, arabinosa y/o xilosa lineal o para producir derivados de xilosa, arabinosa por fermentación, tratamiento enzimático o síntesis química.

[0043] La descripción además proporciona un proceso donde un sustrato con arabinoxilano y/o una biomasa se contacta con una arabinofuranosidasa enzimática capaz de liberar arabinosa de xilosas di-sustituidas. Preferiblemente la enzima capaz de liberar arabinosa de xilosas di-sustituidas es una arabinofuranosidasa. Preferiblemente la alfa-L-arabinofuranosidasa es una alfa-L-arabinofuranosidasa de GH43. La alfa-L-arabinofuranosidasa de GH43 es preferiblemente derivada de origen bacteriano, fúngico o vegetal. Preferiblemente el sustrato con arabinoxilano y/o la biomasa se selecciona de la lista que consiste en cultivos energéticos herbáceos y/o leñosos, cultivos agrícolas y alimentarios, productos de pienso para animales, tubérculos, raíces, tallos, leguminosas, cáscaras de mandioca, vainas de cacao, cáscaras de arroz y/o cascotes, salvado de arroz, mazorcas, paja, cascotes, cáscaras, pulpa de remolacha azucarera, pulpa de semilla de algarroba, pulpas vegetales, desechos de cosecha agrícolas, paja, tallos, hojas, salvado de maíz, cáscaras, mazorcas, cáscara, cubiertas, vainas, desechos de madera, corteza, virutas, serrín, pulpa de madera, licor de pulpa, desecho de papel, cartón, desechos de madera, sólidos de agua de desechos industriales o municipales, abono, subproducto de procesos de elaboración y/o de fermentación, grano de destilación en húmedo, grano de destilación en seco, grano consumido, vinaza y bagazo.

## Enzimas

### Alfa-L-arabinofuranosidasa con actividad hacia xilosas di-sustituidas

[0044] La enzima con actividad hacia xilosas di-sustituidas, por ejemplo tal como una alfa-L-arabinofuranosidasa de GH43, puede ser de origen microbiano, por ejemplo derivable de una cepa de un hongo filamentoso (p. ej., *Humicola*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*) o de una bacteria (p. ej. *Bacillus*, *Bifidobacterium*). Una tal enzima adecuada se puede seleccionar por el ensayo para actividad de alfa-arabinofuranosidasa en el arabinoxilano di-sustituido en la sección de Métodos.

[0045] Preferiblemente la alfa-L-arabinofuranosidasa de GH43 se deriva de *Humicola insolens*. De la forma más preferible la alfa-L-arabinofuranosidasa de GH43 es el polipéptido mostrado como SEC ID NO:1, más preferiblemente el polipéptido mostrado como los aminoácidos 19-558 de la SEC ID NO:1, o incluso más preferible un polipéptido que tiene, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada como los aminoácidos 19-558 de la SEC ID NO:1 (de ahora en adelante "polipéptidos homólogos").

[0046] Una enzima con actividad hacia xilosas di-sustituidas, por ejemplo tal como una alfa-L-arabinofuranosidasa de GH43, se puede adicionar en cantidades de 0,001-1,0 g/kg de sustrato DM, preferiblemente en las cantidades de 0,005-0,5 g/kg de sustrato DM, y de la forma más preferible de 0,05-0,10 g/kg de sustrato DM.

### Alfa-L-arabinofuranosidasa con actividad hacia xilosas mono-sustituidas

[0047] La enzima con actividad hacia xilosas mono-sustituidas en la posición C2 y/o C3, por ejemplo tal como una alfa-L-arabinofuranosidasa de GH51, GH54 o GH62, puede ser de origen microbiano, tal como derivable de una cepa de un hongo filamentoso (p. ej., *Meripilus*, *Humicola*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*) o de

unas bacterias (e.g. *Bacillus*). Preferiblemente la enzima es una alfa-L-arabinofuranosidasa de GH51, e incluso más preferiblemente la alfa-L-arabinofuranosidasa GH51 se deriva de *Meripilus giganteus*. El polipéptido puede preferiblemente tener al menos 75%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada como los aminoácidos 17-643 de la SEC ID NO:2 (de ahora en adelante "polipéptidos homólogos"). Más preferiblemente la alfa-L-arabinofuranosidasa es el polipéptido mostrado como la SEC ID NO:2, incluso más preferiblemente el polipéptido mostrado como los aminoácidos 17-643 de la SEC ID NO:2.

[0048] Alfa-L-arabinofuranosidasa de GH51, GH54 o GH62 se puede adicionar en cantidades de 0,001-1,0 g/kg de sustrato DM, preferiblemente en las cantidades de 0,005-0,5 g/kg de sustrato DM, y de la forma más preferible de 0,05-0,10 g/kg de sustrato DM.

#### Beta-xilosidasa

[0049] La beta-xilosidasa es preferiblemente una beta-xilosidasa de GH3. La beta-xilosidasa puede ser de origen microbiano, tal como derivable de una cepa de un hongo filamentoso (p. ej., *Trichoderma*, *Meripilus*, *Humicola*, *Aspergillus*, *Fusarium* o de una bacteria (p. ej. *Bacillus*). Preferiblemente la beta-xilosidasa es una beta-xilosidasa de GH3 derivada de *Trichoderma reesei* y más preferiblemente la beta-xilosidasa de GH3 es el polipéptido mostrado como SEC ID NO:3 o un polipéptido que tiene al menos 75%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada como aminoácidos SEC ID NO:3 (de ahora en adelante "polipéptidos homólogos"). Beta-xilosidasa de GH3 se puede adicionar en cantidades de 0,001-1,0 g/kg de sustrato DM, preferiblemente en las cantidades de 0,005-0,5 g/kg de sustrato DM, y de la forma más preferible de 0,05-0,10 g/kg de sustrato DM

#### Endo-1,4-beta-xilanasa

[0050] La endo-1,4-beta-xilanasa es preferiblemente una endo-1,4-beta-xilanasa de GH10 o GH11. El endo-1,4-beta-xilanasa puede ser de origen microbiano, tal como derivable de una cepa de un hongo filamentoso (p. ej., *Trichoderma*, *Meripilus*, *Humicola*, *Aspergillus*, *Fusarium*) o de una bacteria (p. ej. *Bacillus*). La endo-1,4-beta-xilanasa es preferiblemente una endo-1,4-beta-xilanasa de GH10 derivada de *Humicola insolens* y más preferiblemente la endo-1,4-beta-xilanasa de GH10 es el polipéptido mostrado como SEC ID NO:4, más preferiblemente como los aminoácidos 17-389 de SEC ID NO:4, o incluso más preferiblemente un polipéptido que tiene al menos 75%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada como aminoácidos 17-389 de la SEC ID NO:4 (de ahora en adelante "polipéptidos homólogos").

[0051] Endo-1,4-beta-xilanasa de GH10 se puede adicionar en cantidades de 0,001-1,0 g/kg de sustrato DM, preferiblemente en las cantidades de 0,005-0,5 g/kg de sustrato DM, y de la forma más preferible de 0,05-0,10 g/kg de sustrato DM.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### Enzimas usadas

[0052] Una alfa-L-arabinofuranosidasa GH43 de *H. insolens* (SEC ID NO:1), una alfa-L-arabinofuranosidasa GH51 de *M. giganteus* (SEC ID NO:2), una beta-xilosidasa GH3 de *Trichoderma Reesei* (SEC ID NO:3) y una endo-1,4-beta-xilanasa GH10 de *H. insolens* (SEC ID NO:4). Las enzimas mencionadas fueron clonadas usando técnicas moleculares básicas (Ausubel et al., 2003, Curr. Prot. Mol. Biol., John Wiley & Sons, Cambridge, USA, Christgau et al. 1995, Curr. Genet. 27, 135-141 ).

[0053] Ultraflo L y Celluclast 1,5 L son composiciones enzimáticas comerciales, y disponibles de Novozymes A/S. Ultraflo L se deriva de *Humicola Insolence* y comprende celulasas y hemicelulasas. Celluclast 1,5 L se deriva de *Trichoderma reesei* y comprende celobiohidrolasas y endoglucanasas.

[0054] Bio-Feed Wheat L es una xilanasa comercial para aplicación en piensos y disponible de Novozymes A/S. Bio- Feed Wheat L se deriva de *Termomyces lanuginosus*.

#### Productos químicos y sustratos

[0055] Arabinosa y xilosa fueron compradas de Merck (Darmstadt, Alemania). Arabinoxilanas de trigo solubles en agua e insolubles en agua fueron obtenidas de Megazyme, (Bray, County Wicklow, Irlanda). El efluente de fermentación de etanol, "vinaza", fue proporcionado por Tate & Lyle, Amylum UK (Greenwich, Reino Unido).

#### Sustrato de arabinoxilano de trigo soluble

[0056] Arabinoxilano de trigo de viscosidad media soluble en agua fue obtenido de Megazyme (Bray, County

Wicklow, Irlanda). Contenidos monosacáridos después de hidrólisis ácida (0,4 N HCl, 2 h, 100°C) y HPAEC fueron: Arabinosa 275,8 mg/g, xilosa 479,2 mg/g (= A:X 0,58), con sólo indicios de galactosa y glucosa. Según la hoja de producto el almidón, beta-glucano, proteína, humedad, y contenido de ceniza en peso fueron <0,1%, <0,1%, 0,9%, 1,9%, y 2,2%, respectivamente.

5

#### Sustrato de vinaza de trigo

[0057] Vinaza de trigo, un subproducto de fermentación de etanol industrial, fue proporcionado por Tate & Lyle, Amylum UK, (Greenwich, Reino Unido). El contenido de sustancia en seco de vinaza fue 9,02 % en peso. Contenidos de monosacáridos después de la hidrólisis ácida (0,4 N HCl, 2 h, 100 °C) y HPAEC fueron: Arabinosa 82,9 g/kg vinaza DM, xilosa 119 g/kg vinaza DM mg/g, galactosa 21,6 g/kg vinaza DM, y 78,2 g/kg vinaza DM. Ácidos orgánicos, proteína, ceniza, y ácido ferúlico constituido ~ 30%, ~ 16%, ~ 11%, y 0,2% en peso, respectivamente de la sustancia seca.

10

#### Preparación de polímeros de arabinoxilano específicos y oligosacáridos

[0058] Arabinoxilano doblemente sustituido fue preparado incubando arabinoxilano de trigo soluble (1g) en 0,1 M tampón de acetato (100 mL), pH 6,0 con 0,167 g  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa de *Meripilus giganteus* (GH51)·kg<sup>-1</sup> arabinoxilano de trigo soluble en agua durante 48 horas a 30°C. Arabinoxilano individualmente sustituido fue preparado incubando arabinoxilano de trigo soluble en agua (1g) en 0,1 M tampón de acetato (42 mL), pH 6,0 con 0,147 g  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa de *Humicola insolens* (GH43) ·kg<sup>-1</sup> arabinoxilano de trigo soluble en agua durante 48 horas a 30°C.

20

Para detener las reacciones enzimáticas las mezclas fueron calentadas a 100°C durante 10 min. Polímeros de arabinoxilano fueron precipitados por adición de etanol (126 ml). Los precipitados fueron filtrados (Miracloth) y secados al vacío.

25

[0059] Los oligosacáridos que contienen grupos de arabinosilo enlazados al terminal (1→3) fueron preparados incubando el arabinoxilano de trigo insoluble en agua (1g) en 0,1 M tampón de acetato (100 mL), pH 6,0 con 6,67 g Shearzyme (xilanasas GH10) ·kg<sup>-1</sup> arabinoxilano de trigo insoluble en agua durante 2 horas a 30°C. Los oligosacáridos que contienen grupos de arabinosilo enlazados a (1→3) interno fueron preparados incubando arabinoxilano de trigo insoluble en agua (1g) en 0,1 M tampón de acetato (100 mL), pH 6,0 con 0,03 g Pentopan Mono (xilanasas GH11) ·kg<sup>-1</sup> arabinoxilano de trigo insoluble en agua durante 2 horas a 30°C. Los oligosacáridos con grupos de arabinosilo enlazados a (1→2) interno fueron preparados incubando arabinoxilano de trigo insoluble en agua (1g) en 0,1 M tampón de acetato (100 mL), pH 6,0 con 0,03 g Pentopan Mono (xilanasas GH11) ·kg<sup>-1</sup> arabinoxilano de trigo insoluble en agua y alfa-L-arabinofuranosidasa de *H. insolens* (GH43) ·kg<sup>-1</sup> arabinoxilano de trigo soluble en agua durante 2 horas a 30°C. Para detener las reacciones enzimáticas las mezclas fueron calentadas a 100°C durante 10 min. Los arabinoxilo-oligosacáridos fueron concentrados en un evaporador giratorio y evaluados por <sup>1</sup>H-NMR.

30

35

#### Análisis de sustrato

[0060] Contenido de arabinosa y xilosa en arabinoxilano con sustratos fueron determinados por hidrólisis ácida con ácido clorhídrico (0,4 N HCl, 2 horas, 100°C) seguido por HPAEC (Sorensen et al., 2003). Todos los rendimientos, incluyendo rendimientos de hidrólisis enzimática, se proporcionan como mg por g sustrato de sustancia seca o como rendimientos relativos en porcentaje.

45

#### Ensayo para actividad hacia actividad de alfa-L-arabinofuranosidasa

[0061] Actividad de alfa-L-arabinofuranosidasa se puede evaluar como descrito por Poutanen et al. (Appl. Microbiol. Biotechnol. 1988, 28, 425-432) usando 5 mM de alfa-L-arabinofuranosida de p-nitrofenilo como sustratos. Las reacciones se pueden llevar a cabo en 50 mM de tampón de citrato a pH 6,0, 40°C con un tiempo de reacción total de 30 min. La reacción se detiene añadiendo 0,5 ml de 1 M carbonato de sodio y el p-nitrofenol liberado se mide a 405 nm. La actividad se expresa en U/ml.

50

#### Ensayo para actividad de alfa-arabinofuranosidasa en arabinoxilano di-sustituido

[0062] Arabinoxilano de trigo soluble en agua de viscosidad media (Megazyme, Bray, Irlanda) fue tratado con una alfa-arabinofuranosidasa de GH51 de *Meripilus giganteus* (SEC ID NO:2) para eliminar sustituyentes de alfa-arabinofuranosilo únicos fijados a la C(O)-3 arabinosa del arabinoxilano para producir un sustrato de arabinoxilano di-sustituido con sustituyentes de arabinofuranosilo fijados a ambos C(O)-2,3 de los residuos de xilosa. El sustrato fue dializado y liofilizado.

60

[0063] Una solución de 0,1% del arabinoxilano di-sustituido fue preparada y la actividad de alfa-

arabinofuranosidasa fue medida mezclando 0,1 ml de enzima, 0,9 ml de tampón (0,12 M de ácido succínico, pH 6,0) y 1,0 ml de solución de sustrato en un tubo de Eppendorf. El tubo de Eppendorf fue incubado a 60°C durante 1 hora con agitación. La cantidad de arabinosa liberada fue medida por HPAEC (cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico).

5

#### HPAEC

[0064] Hidrolizados (10 µl) fueron aplicados sobre un sistema Dionex BioLC equipado con una columna Dionex CarboPac™ PA1 guard (4 x 250 mm) (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EEUU) combinada con una columna CarboPac™ PA1 guard (4 x 50 mm). Los monosacáridos fueron separados isocráticamente con 10 mM de hidróxido de potasio durante 15 min, flujo: 1 mL·min<sup>-1</sup>. Monosacáridos fueron detectados por un detector electroquímico pulsado en el modo de detección amperométrica pulsada. El potencial del electrodo fue programado para +0,1 V (t = 0-0,4 s) a -2,0 V (t = 0,41-0,42 s) a 0,6 V (t = 0,43 s) y finalmente -0,1 V (t = 0,44-0,50 s), mientras se integra la señal resultante de t = 0,2-0,4 s. Una mezcla de arabinosa y xilosa (concentración de cada componente: 0,0025-0,1 g·L<sup>-1</sup>) fue usada como estándar.

10

15

#### Analistas de <sup>1</sup>H-NMR

[0065] Todos los productos de degradación fueron liofilizados dos veces de 99,9% de D<sub>2</sub>O y redisolutos en 99,9% de D<sub>2</sub>O. Algunos hidrolizados fueron dializados (Spectra/Por peso molecular de membrana cortado 1000) para eliminar arabinosa libre antes del análisis espectral. Los espectros <sup>1</sup>H-NMR fueron registrados a 30°C en un instrumento Varian Mercury-VX accionado a 400 MHz y equipados con una sonda auto-conmutable de 4-núcleos. Datos fueron recogidos sobre 128-512 sondeos y la señal HDO fue usada como una señal de referencia (4,67 ppm).

20

25

### **EJEMPLOS**

#### **Ejemplo 1**

#### Hidrólisis enzimática de arabinoxilano insoluble en agua

[0066] Sustrato de arabinoxilano de trigo insoluble en agua (0,05 g) disuelto en 50 ml de agua doblemente desionizada por ensayo (0,1% de DM) fue incubado con una composición de la invención, o con 10 % en peso de un 50:50 de mezcla de Ultraflo y Celluclast 1,5 L. E/S se refiere al peso de preparación enzimática (E) adicionado en porcentaje en peso de sustrato (S).

35

40

[0067] La composición de la invención comprendió 0,075 g GH51 alfa-arabinofuranosidasa de *M. giganteus*/kg de arabinoxilano DM, 0,075 g de alfa-arabinofuranosidasa GH43 de *H. insolens*/kg de arabinoxilano DM, 0,075 g beta-xilosidasa de *T. reesei*/kg arabinoxilano DM, y 0,075 g de xilanasa de *H. insolens*/kg arabinoxilano DM.

[0068] Los tratamientos fueron realizados durante 24 horas a pH 5 y 50°C. Las muestras fueron retiradas después de 24 horas e inmediatamente calentadas a 100°C durante 10 min. Las muestras fueron filtradas (filtro 0,2 µm) y los niveles de arabinosa, y xilosa fueron determinados por HPAEC. Experimentos de hidrólisis enzimática fueron realizados por triplicado y los valores medios proporcionados están en porcentaje de las cantidades liberadas por hidrólisis ácida. Los resultados se presentan en tabla 1.

45

**Tabla 1.** Arabinosa y xilosa liberadas de arabinoxilano de trigo insoluble en agua por hidrólisis enzimática. Los números están en porcentaje en peso de la cantidad de cada monosacárido liberado por hidrólisis ácida de las muestras de arabinoxilano de trigo soluble en agua.

50

<b>Enzima</b>	<b>Arabinosa</b>	<b>Xilosa</b>
Celluclast 1,5 L: Ultraflo L	43	56,7
Composición de la invención	57	64

#### Hidrólisis enzimática de arabinoxilano soluble en agua

[0069] Sustrato de arabinoxilano de trigo soluble en agua (0,05 g) disuelto en 50 ml de agua doblemente desionizada por ensayo (0,1% DM) fue incubado con una composición de la invención, o con 10 % en peso de una mezcla 50:50 de Ultraflo y Celluclast 1,5 L. E/S se refiere al peso de preparación enzimática (E) adicionado en porcentaje en peso de sustrato (S).

55

[0070] La composición de la invención comprendió 0,080 g GH51 alfa-arabinofuranosidasa de *M. giganteus*/kg de arabinoxilano DM, 0,080 g GH43 alfa-arabinofuranosidasa de *H. insolens*/kg de arabinoxilano DM, 0,16 g beta-xilosidasa de *T. reesei*/kg de arabinoxilano DM, y 0,080 g xilanasa de *H. insolens*/kg de arabinoxilano DM.

60

5 [0071] Los tratamientos fueron realizados durante 24 horas a pH 5 y 50°C. Las muestras fueron retiradas después de 24 horas e inmediatamente calentadas a 100°C durante 10 min. Las muestras fueron filtradas (filtro 0,2 microM) y los niveles de arabinosa, y xilosa fueron determinados por HPAEC. Experimentos de hidrólisis enzimática fueron realizados por triplicado y los valores medios proporcionados están en porcentaje de las cantidades liberadas por hidrólisis ácida. Los resultados se presentan en tabla 2.

**Tabla 2.** Arabinosa y xilosa liberadas de arabinoxilano de trigo soluble en agua por hidrólisis enzimática. Los números están en porcentaje en peso de la cantidad de cada monosacárido liberado por hidrólisis ácida de las muestras de arabinoxilano de trigo soluble en agua.

Enzima	Arabinosa	Xilosa
Celluclast 1,5 L: Ultraflo L	25	51
Composición de la invención	116	107

### Ejemplo 2

10 [0072] La hidrólisis de vinaza fue realizada según el método descrito para arabinoxilano soluble en agua en el ejemplo 1 excepto que la dosificación de beta-xilosidasa fue 0,050 g/kg de vinaza DM y el nivel de sustrato fue 5 % en peso DM. Muestras fueron retiradas después de 24 h y calentadas inmediatamente a 100°C durante 10 min para detener la reacción enzimática, centrifugadas (14000 r.p.m., 10 min), filtradas (filtro 0,2 microM) y sometidas a análisis HPAEC para determinar los niveles de arabinosa y xilosa, ver más abajo. Experimentos de hidrólisis enzimática fueron realizados por duplicado y los valores medios proporcionados están en porcentaje de las cantidades liberadas por hidrólisis ácida. Los resultados se presentan en la tabla 2.

15 [0073] La hidrólisis de vinaza fue realizada según el método descrito para arabinoxilano soluble en agua en el ejemplo 1 excepto que la dosificación de beta-xilosidasa fue 0,050 g/kg de vinaza DM y el nivel de sustrato fue 5 % en peso DM. Muestras fueron retiradas después de 24 h y calentadas inmediatamente a 100°C durante 10 min para detener la reacción enzimática, centrifugadas (14000 r.p.m., 10 min), filtradas (filtro 0,2 microM) y sometidas a análisis HPAEC para determinar los niveles de arabinosa y xilosa, ver más abajo. Experimentos de hidrólisis enzimática fueron realizados por duplicado y los valores medios proporcionados están en porcentaje de las cantidades liberadas por hidrólisis ácida. Los resultados se presentan en la tabla 2.

20 **Tabla 3.** Arabinosa y xilosa liberadas de vinaza por hidrólisis enzimática. Los números están en porcentaje en peso de la cantidad de cada monosacárido liberado por hidrólisis ácida de las muestras de arabinoxilano de trigo soluble en agua.

Enzima	Arabinosa	Xilosa
Celluclast 1,5 L:Ultraflo L	77	75
Composición de la invención	103	81

### Ejemplo 3

25 [0073] Arabinoxilano de trigo comprende arabinofuranósido como un monosustituyente enlazado a la 3-posición de xilosa interna y arabinofuranósido enlazado a la 3- y 2-posición en xilosa di-sustituida, respectivamente. Los sustratos fueron producidos comprendiendo sólo uno de los 3 tipos de enlaces de arabinofuranósido. La actividad de las arabinofuranosidasas hacia estos sustratos fue investigada.

30 **Tabla 4.** Actividad en polímeros de arabinoxilano seleccionados, incubación a pH 6, 40°C durante 2 horas.

Sustrato	Enlace	Enzima			
		<i>H. insolens</i> (GH43)	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> (GH43)	<i>H. insolens</i> (GH51)	<i>M. giganteus</i> (GH51)
Arabinoxilano intacto	Mono-sustituido (1→3)	-	-	x	xx
	Di-sustituido (1→2)	-	-	-	-
	Di-sustituido (1→3)	xx	x	-	-
Arabinoxilano di-sustituido	Di-sustituido (1→2)	-	-	-	-
	Di-sustituido (1→3)	xx	xx	-	-

Arabinoxilano mono-sustituido	Mono-sustituido (1→2)	-	-	xx	xx
	Mono-sustituido (1→3)	-	-	xx	xx

xx se refiere a más de 75% de hidrólisis, x(x) a 50-75% de hidrólisis, x a 25-50% de hidrólisis y (x) a 5-25% de hidrólisis. - se refiere a ninguna hidrólisis detectable

#### Ejemplo 4

5 [0074] Arabinoxilano de trigo soluble fue incubado con 0,1 g de proteína enzimática por kg DM de alfa-L-arabinofuranosidasa de *H. insolens* (GH43), *B. adolescentis* (GH43), *H. insolens* (GH51), y *M. giganteus* (GH51). La arabinosa liberada como mg por g de arabinoxilano de trigo soluble en agua, su suma hipotética, y su liberación de arabinosa después de tratamiento con 0,2 g de proteína enzimática por kg DM de una mezcla 50:50 de alfa-L-arabinofuranosidasas de *H. insolens* (GH43), *Bi. sp.* (GH43), *H. insolens* (GH51), y *M. giganteus* (GH51) fueron medidas. Los resultados se expresan como el promedio de determinaciones por triplicado, coeficiente de variación en medio < 6,4.

**Tabla 5.** Arabinosa liberada de arabinoxilano de trigo soluble tratado con alfa-L-arabinofuranosidasa a dos temperaturas diferentes y condiciones de pH.

	pH 6, 40°C	pH 5, 50°C
<i>H. insolens</i> (GH43)	128,0 a	147,0 a
<i>M. giganteus</i> (GH51)	48,15 c	121,0 b
<i>B. adolescentis</i> (GH43)	63,43 b	4,833 d
<i>H. insolens</i> (GH51)	20,75 d	18,47 c

Valores dentro de una columna no compartiendo un índice de letra común difieren con significación estadística (P<0,05).

**Tabla 6.** Arabinosa liberada de arabinoxilano de trigo soluble tratado con mezclas 50%:50% de alfa-L-arabinofuranosidasas a pH 5, 50°C.

	pH 5, 50°C	pH 5, 50°C
<i>H. insolens</i> (GH43) y <i>H. insolens</i> (GH51)	-	168,3 b
<i>H. insolens</i> (GH43) y <i>M. Giganteus</i> (GH51)	-	289,0 a
<i>B. adolescentis</i> (GH43) y <i>H. insolens</i> (GH51)	-	17,43 d
<i>B. adolescentis</i> (GH43) y <i>M. giganteus</i> (GH51)	-	131,0 c

Valores dentro de una columna no compartiendo un índice de letra común difieren con significación estadística (P<0,05).

#### Ejemplo 5

20 [0075] Grano consumido se obtuvo de un proceso de elaboración de cerveza usando malta de cebada molida a martillo. El grano consumido fue liofilizado a un contenido de sustancia en seco de 96,1 % p/p y molido. El material de grano consumido fue suspendido 5 g materia seca/100 ml de ácido succínico - tampón de succinato de sodio pH 5,0 y sometido a hidrólisis por dos tratamientos: 1) un tratamiento convencional usando una mezcla 50:50 de Celluclast 1,5 L + Ultraflo L con 6,5 g de proteína enzimática por kg de materia seca de grano consumido y 2) un tratamiento de la invención aplicando una mezcla 25:25:25:25 en la base de peso de proteína de la alfa-L-arabinofuranosidasa GH43 de *H. insolens* (SEC ID NO:1), la alfa-L-arabinofuranosidasa GH51 de *M. giganteus* (SEC ID NO:2), la beta-xilosidasa GH3 de *Trichoderma reesei* (SEC ID NO:3) y la endo-1,4-beta-xilanasasa GH10 de *H. insolens* (SEC ID NO:4). Un equivalente de dosificación enzimática a 0,6 g de proteína enzimática por kg de sustancia seca de grano consumido fue usada.

[0076] La hidrólisis fue realizada en tubos Ependorfer incubados en un Thermomixer Compact a 1000 r.p.m.

durante 16 horas a 50°C. Las muestras fueron cocinadas durante 10 minutos, centrifugadas durante 10 minutos a 14000 x g y la fase soluble fue carbohidratos analizados en HPLC. HPLC fue realizada en un Dionex BioLC usando una bomba de gradiente GS50, automuestreador AS50, y un detector electroquímico ED40. La concentración de arabinosa liberada y xilosa fue medida.

5

**Tabla 7:** Grano consumido.: Resultados de análisis HPLC de arabinosa y xilosa liberada en g/litro.

	Arabinosa	Xilosa
Control, no enzima	0,00	0,00
1) Tratamiento convencional	1,19	1,98
2) Tratamiento de la invención	1,48	2,12

**Ejemplo 6**

10

[0077] Una solución que contiene arabinoxilano se obtuvo cociendo paja de trigo a 190°C seguido por separación del líquido de la paja por filtración. En todos los experimentos se diluyó 1,5 g del líquido adicionalmente a 2,0 g por adición de ácido/base para ajuste del pH, por adición de solución enzimática y por adición de agua desionizada. El líquido fue incubado con 2,5 g de proteína enzimática por litro de volumen de reacción con la mezcla enzimática de la invención, con la mezcla de celulosa convencional que consiste en una mezcla 50:50 de Ultraflo y Celluclast 1,5 L (proporción de mezcla basada en contenido de proteína).

15

20

[0078] La composición de la invención comprendió una mezcla 10:10:5:25 en base de peso de proteína de la alfa-arabinofuranosidasa de *H. insolens* (SEC ID NO:1), la alfa-arabinofuranosidasa de *M. giganteus* (SEC ID NO:2), la beta-xilosidasa de *T. reesei* (SEC ID NO:3) y la xilanasa de *H. insolens* (SEC ID NO:4). Los tratamientos fueron realizados durante 24 horas a tres niveles de pH (4, 5, 6) y a dos temperaturas (40, 50°C). Las muestras fueron retiradas después de 24 horas e inmediatamente calentadas a 100°C durante 10 min. Las muestras fueron filtradas (filtro 0,2 microM) y los niveles de arabinosa, y xilosa fueron determinados por HPAEC. Todos los experimentos de hidrólisis enzimática fueron realizados por duplicado y los valores medios proporcionados están en porcentaje de las cantidades liberadas por hidrólisis ácida. Los resultados se presentan en la tabla 8.

25

**Tabla 8.** Arabinosa y xilosa liberada de arabinoxilano de trigo soluble en agua por hidrólisis enzimática. Los números están en porcentaje en peso de la cantidad de cada monosacárido liberado por hidrólisis ácida del arabinoxilano de trigo soluble en agua.

30

Temperatura [°C]	pH	Arabinosa		Xilosa	
		Referencia	Invención	Referencia	Invención
40	4	63	95	66	72
40	5	70	91	71	78
40	6	76	94	79	88
50	4	60	93	71	72
50	5	66	92	81	88
50	6	87	99	87	87

Listado de secuencias

35

[0079]

<110> Novozymes A/S

<120> Hidrólisis de arabinoxilano

40

<130> 10882.504-WO

<160> 4

45

<170> Versión de patentIn 3,3

<210> 1

<211> 558

<212> PRT  
 <213> Humicola insolence

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (19)..(558)

5

<400> 1

```

Met Leu Gly Leu Lys Val Leu Cys Leu Ser Ala Val Val Gly Thr Ala
      -15      -10      -5

Val Ser Val Pro His Ala Gly Asn Leu Pro Arg Gln Ala Ser Thr Phe
      -1  1      5      10

Thr Asn Pro Val Leu Trp Glu Asp His Pro Asp Leu Glu Val Phe Arg
15      20      25      30

Val Gly Ser Val Phe Tyr Tyr Ser Ser Ser Thr Phe Ala Tyr Ser Pro
      35      40      45

Gly Ala Pro Val Leu Lys Ser Tyr Asp Leu Val His Trp Thr Pro Val
      50      55      60
.....
Thr His Ser Val Pro Arg Leu Asn Phe Gly Ser Asn Tyr Asp Leu Pro
      65      70      75

Ser Gly Thr Pro Gly Ala Tyr Val Lys Gly Ile Trp Ala Ser Thr Leu
      80      85      90

Arg Tyr Arg Arg Ser Asn Asp Arg Phe Tyr Trp Tyr Gly Cys Val Glu
95      100      105      110

Gly Arg Thr Tyr Leu Trp Thr Ser Pro Gly Gly Asn Ala Leu Ala Asn
      115      120      125

Asn Gly Glu Val Pro Pro Ser Ala Trp Asn Trp Gln His Thr Ala Thr
      130      135      140

Ile Asp Asn Cys Tyr Tyr Asp Ala Gly Leu Leu Ile Asp Asp Asp Asp
145      150      155
    
```

10

Thr Met Tyr Ile Ala Tyr Gly Asn Pro Thr Ile Asn Val Ala Gln Leu  
 160 165 170  
 Ser Pro Asp Gly Thr Arg Gln Val Arg Val Gln Gln Arg Val Tyr Ala  
 175 180 185 190  
 His Pro Gln Gly Gln Thr Val Glu Gly Ala Arg Met Tyr Lys Ile Arg  
 195 200 205  
 Gly Asn Tyr Tyr Ile Leu Val Thr Arg Pro Ala Asp Ala Glu Tyr Val  
 210 215 220  
 Leu Arg Ser Thr Thr Gly Ser Pro Phe Gly Pro Tyr Glu Ala Arg Thr  
 225 230 235  
 Leu Val Ser Arg Ile Gln Gly Pro Leu Ala Asn Ala Gly Phe Ala His  
 240 245 250  
 Gln Gly Gly Ile Val Asp Ala Pro Asp Gly Thr Trp His Tyr Val Ala  
 255 260 265 270  
 Phe Met Asp Ala Tyr Pro Gly Gly Arg Ile Pro Val Val Ala Pro Leu  
 275 280 285  
 Arg Trp Thr Ala Asp Gly Trp Pro Glu Val Val Thr Asp Ser Gln Gly  
 290 295 300  
 Arg Trp Gly Thr Ser Tyr Pro Ile Pro Val Arg Gly Ala Lys Asn Ala  
 305 310 315  
 Thr Glu Gly Leu Ala Ser Thr Asp Leu Asp Glu Phe Arg Gly Thr Arg  
 320 325 330  
 Phe Ser Glu His Trp Glu Trp Asn His Asn Pro Asp Thr Ser Lys Phe  
 335 340 345 350  
 Thr Leu Leu Gly Gly Asn Glu Gly Gly Leu Ile Leu Arg Thr Ala Thr  
 355 360 365  
 Val Thr Gly Asp Leu Phe Ala Ala Arg Asn Thr Leu Thr Arg Arg Ile  
 370 375 380  
 Ala Gly Pro Lys Ala Ser Gly Ile Phe Arg Leu Asp Val Arg Gly Met  
 385 390 395  
 Arg Asp Gly Asp Arg Ala Gly Ala Val Leu Phe Arg Asp Arg Ala Ala  
 400 405 410  
 Tyr Ile Gly Val Trp Lys Gln Gly Asn Glu Ala Arg Ile Val Met Val  
 415 420 425 430

Asp Asp Leu Arg Leu Asn Glu Asp Gly Trp Arg Thr Ala Ser Thr Gly  
 435 440 445  
 Arg Val Ala Ala Asn Gly Pro Val Ile Asp Thr Asn Ala Gln Gln Asp  
 450 455 460  
 Ile Trp Leu Arg Ile Asp Ala Asp Ile Thr Pro Ala Phe Gly Thr Asn  
 465 470 475  
 Thr Glu Arg Thr Thr Thr Phe Tyr Tyr Ser Ile Asp Gly Gly Arg Thr  
 480 485 490  
 Tyr Thr Arg Leu Gly Pro Ala Phe Ala Met Thr Asn Ser Trp Arg Tyr  
 495 500 505 510  
 Phe Thr Gly Tyr Arg Phe Gly Val Phe Asn Phe Ser Thr Lys Ser Leu  
 515 520 525  
 Gly Gly Glu Val Lys Val Lys Gly Phe Lys Met Asn Met Ile  
 530 535 540

<210> 2  
 <211> 643  
 5 <212> PRT  
 <213> Meripilus giganteus

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 10 <222> (17)..(643)  
 <400> 2

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

2

Thr Asn Glu Gly Phe Trp Gly Ile Lys Val Asp Ser Thr Trp Thr Tyr  
 100 105 110  
 Lys Ala Ser Leu Phe Phe Arg Phe Pro Thr Ser Ser Ser Phe Ser Gly  
 115 120 125  
 Ala Leu Thr Val Gly Leu Gln Thr Asn Ala Gly Arg Val Leu Ala Gln  
 130 135 140  
 Asn Ser Thr Gln Ile Arg Gly Thr Thr Thr Lys Trp Thr Gln Ile Asn  
 145 150 155 160  
 Leu Glu Leu His Pro Thr Ala Ser Ala Pro Asp Val Ser Asn Ser Phe  
 165 170 175  
 Phe Val Thr Ile Asp Gly Ala Ala Gly Ala Gly Gln Thr Ile Asn Phe  
 180 185 190  
 Ala Met Phe Ser Leu Phe Pro Pro Thr Phe Lys Asn Arg Pro Asn Gly  
 195 200 205  
 Leu Arg Ala Asp Ile Ala Glu Thr Leu Ala Glu Met Gly Pro Ser Phe  
 210 215 220  
 Phe Arg Phe Pro Gly Gly Asn Asn Leu Glu Gly Gln Thr Thr Ala Thr  
 225 230 235 240  
 Arg Trp Gln Trp Asn Ala Thr Val Gly Ser Leu Leu Asp Arg Pro Gly  
 245 250 255  
 Arg Val Gly Asp Trp Gly Tyr Val Asn Thr Asp Gly Leu Gly Leu Leu  
 260 265 270  
 Glu Tyr Leu Gln Phe Phe Glu Asp Thr Gly Met Glu Pro Ile Met Ala  
 275 280 285  
 Val Trp Ala Gly Tyr Ser Leu Gly Gly Thr Ser Leu Ala Glu Asn Gln  
 290 295 300  
 Leu Ala Pro Tyr Ile Gln Gln Ala Ile Asp Gln Ile Asn Phe Val Ile  
 305 310 315 320  
 Gly Asp Pro Ala Lys Ser Ala Pro Ala Ala Leu Arg Ala Ser Leu Gly  
 325 330 335  
 His Pro Glu Pro Phe Thr Leu Arg Phe Val Glu Val Gly Asn Glu Asp  
 340 345 350  
 Phe Phe Ala Ala Gly Ser Tyr Pro Tyr Arg Trp His Asp Phe Val Thr  
 355 360 365

Ala Leu Gln Ala Gln Phe Pro Gln Ile Arg Phe Ile Ala Thr Thr Asn  
 370 375 380

Ala Trp Asn Pro Val Leu Ser Pro Val Pro Gln Ser Tyr Asp Val His  
 385 390 395 400

Val Tyr Gln Thr Pro Thr Trp Phe Tyr Gln Asn Ala Phe Tyr Tyr Asp  
 405 410 415

Gly Phe Gln Arg Asn Gly Thr Thr Tyr Phe Glu Gly Glu Tyr Ala Ala  
 420 425 430

Ile Ser Thr Asn Ala Asn Asp Leu Phe Gly Thr Val Ala Asp Gly Arg  
 435 440 445

Leu Ala Phe Pro Thr Val Gln Ser Ala Thr Gly Glu Ala Ala Phe Met  
 450 455 460

Thr Gly Leu Glu Arg Asn Ser Asp Ile Val Phe Ala Ala Ser Tyr Ala  
 465 470 475 480

Pro Leu Leu Gln His Val Asn Ser Thr Gln Trp Thr Pro Asp Leu Val  
 485 490 495

Ser Tyr Asp Ala Gly Ser Val Ile Lys Ser Thr Ser Phe Phe Ala Gln  
 500 505 510

Lys Leu Phe Ala Leu Asn Lys Gly Asp Gln Tyr Leu Pro Ser Thr Leu  
 515 520 525

Pro Thr Asn Gly Gly Thr Leu His Trp Ser Ile Thr Arg Ala Ser Ser  
 530 535 540

Ser Gly Lys Thr Phe Ile Lys Ile Ala Asn Ala Gly Ser Ser Ala Gln  
 545 550 555 560

Ser Leu Thr Phe Gln Leu Thr Gln Phe Asn Ser Val Ser Ser Thr Gly  
 565 570 575

Thr Leu Gln Val Leu Thr Gly Pro Glu Thr Ala Ser Asn Thr Pro Glu  
 580 585 590

Ala Pro Gln Ala Ile Val Pro Lys Thr Ser Thr Ile Gly Thr Gly Lys  
 595 600 605

Thr Phe Thr Tyr Asn Ala Pro Ala Phe Ser Val Ser Val Ile Thr Val  
 610 615 620

Thr Thr Asn  
 625

<210> 3  
 <211> 797

<212> PRT  
 <213> Trichoderma reesei

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (1)..(797)

5

<400> 3

```

Met Val Asn Asn Ala Ala Leu Leu Ala Ala Leu Ser Ala Leu Leu Pro
 1          5          10          15

Thr Ala Leu Ala Gln Asn Asn Gln Thr Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Gln
 20          25          30

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

Phe Pro Asp Cys Glu His Gly Pro Leu Lys Asn Asn Leu Val Cys Asp
 50          55          60

Ser Ser Ala Gly Tyr Val Glu Arg Ala Gln Ala Leu Ile Ser Leu Phe
 65          70          75          80

Thr Leu Glu Glu Leu Ile Leu Asn Thr Gln Asn Ser Gly Pro Gly Val
 85          90          95

Pro Arg Leu Gly Leu Pro Asn Tyr Gln Val Trp Asn Glu Ala Leu His
100          105          110

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

Ala Thr Ser Phe Pro Met Pro Ile Leu Thr Thr Ala Ala Leu Asn Arg
130          135          140

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

Phe Ser Asn Ser Gly Arg Tyr Gly Leu Asp Val Tyr Ala Pro Asn Val
165          170          175

Asn Gly Phe Arg Ser Pro Leu Trp Gly Arg Gly Gln Glu Thr Pro Gly
180          185          190

Glu Asp Ala Phe Phe Leu Ser Ser Ala Tyr Thr Tyr Glu Tyr Ile Thr
195          200          205

Gly Ile Gln Gly Gly Val Asp Pro Glu His Leu Lys Val Ala Ala Thr
210          215          220
    
```

10

Val Lys His Phe Ala Gly Tyr Asp Leu Glu Asn Trp Asn Asn Gln Ser  
 225 230 235 240

Arg Leu Gly Phe Asp Ala Ile Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ser Glu Tyr  
 245 250 255

Tyr Thr Pro Gln Phe Leu Ala Ala Ala Arg Tyr Ala Lys Ser Arg Ser  
 260 265 270

Leu Met Cys Ala Tyr Asn Ser Val Asn Gly Val Pro Ser Cys Ala Asn  
 275 280 285

Ser Phe Phe Leu Gln Thr Leu Leu Arg Glu Ser Trp Gly Phe Pro Glu  
 290 295 300

Trp Gly Tyr Val Ser Ser Asp Cys Asp Ala Val Tyr Asn Val Phe Asn  
 305 310 315 320

Pro His Asp Tyr Ala Ser Asn Gln Ser Ser Ala Ala Ala Ser Ser Leu  
 325 330 335

Arg Ala Gly Thr Asp Ile Asp Cys Gly Gln Thr Tyr Pro Trp His Leu  
 340 345 350

Asn Glu Ser Phe Val Ala Gly Glu Val Ser Arg Gly Glu Ile Glu Arg  
 355 360 365

Ser Val Thr Arg Leu Tyr Ala Asn Leu Val Arg Leu Gly Tyr Phe Asp  
 370 375 380

Lys Lys Asn Gln Tyr Arg Ser Leu Gly Trp Lys Asp Val Val Lys Thr  
 385 390 395 400

Asp Ala Trp Asn Ile Ser Tyr Glu Ala Ala Val Glu Gly Ile Val Leu  
 405 410 415

Leu Lys Asn Asp Gly Thr Leu Pro Leu Ser Lys Lys Val Arg Ser Ile  
 420 425 430

Ala Leu Ile Gly Pro Trp Ala Asn Ala Thr Thr Gln Met Gln Gly Asn  
 435 440 445

Tyr Tyr Gly Pro Ala Pro Tyr Leu Ile Ser Pro Leu Glu Ala Ala Lys  
 450 455 460

Lys Ala Gly Tyr His Val Asn Phe Glu Leu Gly Thr Glu Ile Ala Gly  
 465 470 475 480

Asn Ser Thr Thr Gly Phe Ala Lys Ala Ile Ala Ala Ala Lys Lys Ser  
 485 490 495

Asp Ala Ile Ile Tyr Leu Gly Gly Ile Asp Asn Thr Ile Glu Gln Glu  
 500 505 510  
 Gly Ala Asp Arg Thr Asp Ile Ala Trp Pro Gly Asn Gln Leu Asp Leu  
 515 520 525  
 Ile Lys Gln Leu Ser Glu Val Gly Lys Pro Leu Val Val Leu Gln Met  
 530 535 540  
 Gly Gly Gly Gln Val Asp Ser Ser Ser Leu Lys Ser Asn Lys Lys Val  
 545 550 555 560  
 Asn Ser Leu Val Trp Gly Gly Tyr Pro Gly Gln Ser Gly Gly Val Ala  
 565 570 575  
 Leu Phe Asp Ile Leu Ser Gly Lys Arg Ala Pro Ala Gly Arg Leu Val  
 580 585 590  
 Thr Thr Gln Tyr Pro Ala Glu Tyr Val His Gln Phe Pro Gln Asn Asp  
 595 600 605  
 Met Asn Leu Arg Pro Asp Gly Lys Ser Asn Pro Gly Gln Thr Tyr Ile  
 610 615 620  
 Trp Tyr Thr Gly Lys Pro Val Tyr Glu Phe Gly Ser Gly Leu Phe Tyr  
 625 630 635 640  
 Thr Thr Phe Lys Glu Thr Leu Ala Ser His Pro Lys Ser Leu Lys Phe  
 645 650 655  
 Asn Thr Ser Ser Ile Leu Ser Ala Pro His Pro Gly Tyr Thr Tyr Ser  
 660 665 670  
 Glu Gln Ile Pro Val Phe Thr Phe Glu Ala Asn Ile Lys Asn Ser Gly  
 675 680 685  
 Lys Thr Glu Ser Pro Tyr Thr Ala Met Leu Phe Val Arg Thr Ser Asn  
 690 695 700  
 Ala Gly Pro Ala Pro Tyr Pro Asn Lys Trp Leu Val Gly Phe Asp Arg  
 705 710 715 720  
 Leu Ala Asp Ile Lys Pro Gly His Ser Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ile  
 725 730 735  
 Pro Val Ser Ala Leu Ala Arg Val Asp Ser His Gly Asn Arg Ile Val  
 740 745 750  
 Tyr Pro Gly Lys Tyr Glu Leu Ala Leu Asn Thr Asp Glu Ser Val Lys  
 755 760 765

Leu Glu Phe Glu Leu Val Gly Glu Glu Val Thr Ile Glu Asn Trp Pro  
 770 775 780

Leu Glu Glu Gln Gln Ile Lys Asp Ala Thr Pro Asp Ala  
 785 790 795

<210> 4  
 <211> 389  
 <212> PRT  
 5 <213> Humicola insolens

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (17)..(389)

10 <400> 4

Met Arg Ser Ile Ala Leu Ala Leu Ala Ala Ala Pro Ala Val Leu Ala  
 -15 -10 -5 -1

Gln Ser Gln Leu Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Asn Gly Pro  
 1 5 10 15

Thr Thr Cys Val Ser Gly Ala Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr  
 20 25 30

His Gln Cys Leu Pro Gly Gly Asn Asn Asn Asn Pro Pro Pro Ala Thr  
 35 40 45

Thr Ser Gln Trp Thr Pro Pro Pro Ala Gln Thr Ser Ser Asn Pro Pro  
 50 55 60

Pro Thr Gly Gly Gly Gly Gly Asn Thr Leu His Glu Lys Phe Lys Ala  
 65 70 75 80

Arg Gly Lys Gln Tyr Phe Gly Thr Glu Ile Asp His Tyr His Leu Asn  
 85 90 95

Asn Asn Gln Leu Met Glu Ile Ala Arg Arg Glu Phe Gly Gln Ile Thr  
 100 105 110

His Glu Asn Ser Met Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Arg Gly Ser  
 115 120 125

Phe Ser Phe Gly Asn Ala Asp Arg Val Val Asp Trp Ala Thr Ser Asn  
 130 135 140

Gly Lys Leu Ile Arg Gly His Thr Leu Leu Trp His Ser Gln Leu Pro  
 145 150 155 160

Gln Trp Val Gln Asn Ile Asn Asp Arg Asn Thr Leu Thr Gln Val Ile  
 165 170 175

Glu Asn His Val Arg Thr Val Met Thr Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Phe  
 180 185 190  
 His Tyr Asp Val Val Asn Glu Ile Leu Asp Glu Asn Gly Gly Leu Arg  
 195 200 205  
 Asn Ser Val Phe Ser Arg Val Leu Gly Glu Asp Phe Val Gly Ile Ala  
 210 215 220  
 Phe Arg Ala Ala Arg Ala Ala Asp Pro Asp Ala Lys Leu Tyr Ile Asn  
 225 230 235  
 Asp Tyr Asn Leu Asp Ser Ala Asn Tyr Ala Lys Thr Arg Gly Met Ile  
 245 250 255  
 Asn Leu Val Asn Lys Trp Val Ser Gln Gly Val Pro Ile Asp Gly Ile  
 260 265 270  
 Gly Thr Gln Ala His Leu Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Pro Ala Ser  
 275 280 285  
 Gly Val Pro Ala Ala Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ala Asn Val Lys Glu  
 290 295 300  
 Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Gln Gly Ala Gly Ala Asn Asp Tyr  
 305 310 315 320  
 Val Thr Val Ala Asn Ala Cys Leu Asn Val Gln Lys Cys Val Gly Ile  
 325 330 335  
 Thr Val Trp Gly Val Ser Asp Arg Asp Thr Trp Arg Ser Asn Glu Asn  
 340 345 350  
 Pro Leu Leu Tyr Asp Arg Asp Tyr Arg Pro Lys Ala Ala Tyr Asn Ala  
 355 360 365  
 Leu Met Asn Ala Leu  
 370

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Proceso que comprende i) la puesta en contacto de un sustrato que contiene arabinoxilano, con una composición que comprende,
- a) una alfa-L-arabinofuranosidasa de GH43, con actividad hacia xilosas di-sustituidas,  
    b) una alfa-L-arabinofuranosidasa de GH51, GH54 o GH62 con actividad hacia xilosas mono-sustituidas en la posición C2 o C3, y
- 10 ii) la hidrólisis de arabinoxilano, donde la alfa-L-arabinofuranosidasa de GH43 tiene al menos 85% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada como los aminoácidos 19-558 de la SEC ID NO: 1 y está presente en una cantidad de al menos 5% p/p de proteína enzimática total presente en la composición.
- 15 2. Proceso según la reivindicación 1, donde la composición comprende además, una enzima seleccionada del grupo que consiste en una beta-xilosidasa, una endo-1,4-beta xilanasas, una acetil xilano esterasa, una feruloil esterasa, una alfa-amilasa, una glucoamilasa, una fitasa, una proteasa, beta-glucanasa, celulasa, celobiohidrolasa, y beta-glicosidasa.
- 20 3. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 el cual comprende la producción de un hidrolizado que comprende xilosa lineal y/o xilo-oligosacárido y/o xilosa y/o arabinosa.
4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el cual comprende la producción de un producto de pienso para animales.
- 25 5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el cual comprende la modificación de una fibra alimenticia.
6. Composición para la hidrólisis de arabinoxilano, donde dicha composición comprende las actividades enzimáticas;
- 30      a) una alfa-L-arabinofuranosidasa fúngica de GH43 con actividad hacia xilosas di-sustituidas, y  
    b) una alfa-L-arabinofuranosidasa de GH51, GH54 o GH62 con actividad hacia xilosas mono-sustituidas en la posición C2 o C3,
- 35 donde la alfa-L-arabinofuranosidasa de GH43 tiene al menos un 85% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada como los aminoácidos 19-558 de la SEC ID NO: 1 y está presente en una cantidad de al menos 5% p/p de proteína enzimática total presente en la composición.
- 40 7. Composición según la reivindicación 6, donde las actividades enzimáticas además comprenden una enzima seleccionada del grupo que consiste en una beta-xilosidasa, una endo-1,4-beta-xilanasas, una acetil xilano esterasa, una feruloil esterasa, una alfa-amilasa, una glucoamilasa, una fitasa, una proteasa, beta-glucanasa, celulasa, celobiohidrolasa, y beta-glicosidasa.
- 45 8. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 6-7 para tratamiento de un sustrato con arabinoxilano.
9. Uso según la reivindicación 8 en un proceso de fermentación.
- 50 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9 para la reducción de la viscosidad de un lodo y/o solución que comprende un sustrato con arabinoxilano.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 para producir un producto de pienso para animales o un producto alimenticio.
- 55 12. Proceso que comprende i) la puesta en contacto de un sustrato con arabinoxilano, con una composición que comprende,
- 60      a) una alfa-L-arabinofuranosidasa de GH43, con actividad hacia xilosas di-sustituidas,  
    b) una alfa-L-arabinofuranosidasa de GH51 con actividad hacia xilosas mono-sustituidas en la posición C2 o C3, y
- ii) la hidrólisis de arabinoxilano, donde la alfa-L-arabinofuranosidasa de GH43 está presente en una cantidad de al menos 5% p/p de proteína enzimática total presente en la composición y la alfa-L-arabinofuranosidasa de GH51 es un GH51 con al menos un 85% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada como los aminoácidos 17-643 de la SEC ID NO: 2.
- 65

