

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 910**

51 Int. Cl.:  
**C12P 19/44** (2006.01)  
**A23L 1/185** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08775209 .3**  
96 Fecha de presentación: **18.07.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2185717**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.05.2010**

54 Título: **Producción de maltobionato**

30 Prioridad:  
**27.07.2007 EP 07113338**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.04.2012**

73 Titular/es:  
**NOVOZYMES A/S  
KROGSHÖJVEJ 36  
2880 BAGSVÅRD, DK**

72 Inventor/es:  
**NIELSEN, Per Munk**

74 Agente/Representante:  
**Tomas Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 377 910 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Producción de maltobionato

## 5 Campo de la invención

[0001] La invención proporciona una vía de productos de cerveza de preservación con maltobionato producido directamente a partir de la maltosa ya presente en el producto de cerveza, usando un proceso enzimático.

## 10 Antecedentes de la invención

[0002] La prevención de la degradación oxidante de productos alimenticios y de pienso es muy importante para la conservación de la calidad de los productos. Procesos oxidantes en los productos pueden resultar en cambios en el color, sabor, aroma u otros cambios organolépticos inaceptables. Además, la oxidación puede causar daños a los aminoácidos esenciales y suponer la pérdida de vitaminas. En particular, productos alimenticios con ácidos grasos poliinsaturados son susceptibles de oxidación, potencialmente dando como resultado productos alimenticios rancios.

[0003] Una reacción de oxidación ocurre cuando una molécula de alimento, por ejemplo un ácido graso, se combina con oxígeno en presencia de radicales libres; metales traza, tales como Fe y Cu; o especies de oxígeno reactivas, tales como oxígeno singlete, peróxidos o hidroperóxido. Se utilizan antioxidantes para suprimir estas reacciones. Ejemplos de antioxidantes generalmente utilizados son butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT), que son principalmente usados en alimentos que son ricos en grasas y aceites, al igual que sulfitos, que se usan principalmente como antioxidantes para prevenir o reducir la decoloración de frutas y verduras. No obstante, BHA y BHT son sospechosos de causar tumores cuando se usan en concentraciones altas y pueden por lo tanto no ser seguros para la salud humana y los sulfitos son conocidos porque destruyen la vitamina B. Por estas razones, antioxidantes naturales o biológicos, tales como, tocoferol (vitamina E), ácido L-ascórbico, ácido cítrico, melanoidina, flavonoides y ácido gálico son generalmente preferidos. Agentes quelantes tales como EDTA, sideróforos (agentes quelantes de hierro de microorganismos), ácido cítrico y ácido lactobiónico también han sido usados para tratar problemas con la oxidación debido a su capacidad para prevenir que los metales traza provoquen la oxidación.

[0004] La patente estadounidense n°. 3,899, 604 divulga la producción de ácido maltobiónico de maltosa por oxidación fermentativa usando una especie de *Pseudomonas gravolens* y el uso de ácido maltobiónico como un aditivo alimenticio; el ácido maltobiónico tiene un sabor suavemente agrio y también contribuye a la viscosidad de los productos alimenticios en los que está contenido. Además, el ácido maltobiónico puede mejorar el olor natural y sabor de ciertos productos alimenticios (mejorador del sabor) como se describe en la patente estadounidense n°. 3,829,583. No obstante, no hay ninguna indicación de que el maltobionato contribuya con un efecto antioxidante en el alimento.

[0005] La patente europea n°. 0 384 534 B1 divulga la producción de ácido maltobiónico a partir de maltosa por oxidación fermentativa usando una cepa de *Pseudomonas cepacia*.

[0006] Maltosa y maltotriosa son los azúcares mayores en el mosto de cerveza (App Env Microbiol, 2005, págs. 7846-7857).

[0007] La oxidación no es sólo una consecuencia durante el almacenamiento prolongado, sino que puede también causar cambios indeseables a un producto durante la producción, en particular cuando el oxígeno está presente durante la producción. Consecuentemente, los métodos para suministrar antioxidantes naturales durante la producción del alimento serían deseables.

## 50 Resumen de la invención

[0008] La presente invención proporciona un método para impedir reacciones de oxidación en los productos de cerveza por producción de maltobionato a partir de la maltosa presente en el mosto o trituración por un proceso enzimático.

## 55 Descripción de la invención

[0009] Según la presente invención, reacciones oxidantes en los productos de cerveza pueden ser evitadas o impedidas durante su producción por el maltobionato. Para nuestro conocimiento, es la primera vez que el maltobionato ha sido usado como un antioxidante en la cerveza durante y después de la producción.

## 60 Definiciones:

[0010] El término "complemento" se entiende como la parte de la malta molida que no es malta de cebada. El complemento puede comprender cualquier material vegetal rico en almidón, por ejemplo grano no malteado, tal como cebada, arroz, maíz, trigo, centeno, sorgo y azúcar fácilmente fermentable y/o jarabe.

[0011] Como se utiliza en este caso el término "**una fracción aislada de un proceso de producción de alimento o**

5 **pienso**" debe ser entendido como una parte aislada que contiene esencialmente todos los ingredientes normalmente usados en la parte del proceso de donde ésta es aislada. Preferiblemente, la fracción contiene una cantidad aumentada de almidón en comparación con aquella que está normalmente presente en la parte del proceso del cual es aislada. La fracción se puede obtener en cualquier etapa durante el proceso de producción, y puede también ser el producto final. En el caso de que se desee una cantidad aumentada de almidón una cantidad adicional del ingrediente que contiene almidón del proceso o almidón puro se puede añadir a la fracción aislada.

10 [0012] Como se utiliza en este caso el término "**malta molida**" se entiende como el material que contiene almidón o azúcar que es la base para la producción de cerveza, por ejemplo la malta de cebada y el complemento.

15 [0013] El término "**enzima aislada**" como se utiliza en este caso se refiere a un polipéptido con la actividad enzimática descrita, donde el polipéptido es al menos 20% puro, preferiblemente al menos 40% puro, más preferiblemente al menos 60% puro, incluso más preferiblemente al menos 80% puro, de la forma más preferible al menos 90% puro, e incluso de la forma más preferible al menos 95% puro, según es determinado por SDS-PAGE.

[0014] El término "**malta**" se entiende como cualquier grano de cereal malteado, en particular cebada.

20 [0015] El término "**maltobionato**" como se usa aquí se refiere a ácido maltobiónico (CAS Reg. N°. 534-42-9; ácido 4-O-alfa-D-Glucopiranosil-D-glucónico) o sales derivadas. Sales adecuadas incluyen, pero de forma no limitativa, maltobionato de Na, maltobionato de Ca, maltobionato de NH<sub>4</sub> y maltobionato de K.

[0016] El término "**trituración**" se entiende como una suspensión acuosa que contiene almidón que comprende la malta molida mojada en el agua.

25 [0017] El término "**maltosa pura**" debe ser entendido como una composición que sólo contiene maltosa, agua, sales inorgánicas y potencialmente un agente amortiguador tal como sales inorgánicas (p. ej. sal de fosfato, sal de carbonato, sal de hidróxido, etc.), sales orgánicas (p. ej. fosfato de citrato, acetato sódico, etc.), y otros tampones orgánicos (p. ej. HEPES, Tris, etc.).

30 [0018] El término base "**débil**" vs "**fuerte**" se refiere a la capacidad de la base para disociarse. En el presente contexto, una base débil es definida como una base con un valor pK<sub>b</sub> de como mínimo 3.5 (para bases dipróticas como CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> este valor pK<sub>b</sub> se refiere a la primera etapa).

35 [0019] El término "**mosto**" se entiende como la solución no fermentada drenada después de la extracción de la malta molida durante la trituración.

Enzimas

40 [0020] El maltobionato se puede generar por oxidación de maltosa. La oxidación puede ser realizada usando bromuro, no obstante esto no es deseable en un proceso de producción de alimentos.

45 [0021] En la presente invención, la conversión de maltosa en maltobionato es el producto de una reacción enzimática donde una oxidorreductasa que tiene especificidad de sustrato para maltosa, cataliza la conversión. Las oxidorreductasas son enzimas que catalizan la transferencia de electrones de una molécula a otra. Las deshidrogenasas y oxidasas pertenecen a la clase enzimática de las oxidorreductasas. Generalmente, las deshidrogenasas necesitan la presencia de un cofactor, por ejemplo NAD/NADP o una coenzima de flavina, tal como, FAD o FMN, y éste puede también ser el caso de las oxidasas. A menos que se sugiera alguna cosa más, las enzimas descritas abajo y en toda la descripción son enzimas aisladas con cofactor si se requiere.

50 [0022] Una categoría de oxidorreductasas, adecuadas para el uso en la presente invención, son las oxidasas que catalizan una reacción de oxidación/reducción implicando oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) como el aceptor electrónico. En estas reacciones, el oxígeno se reduce a agua (H<sub>2</sub>O) o peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En particular, las oxidasas de carbohidrato que catalizan la conversión de maltosa en maltosa-delta-lactona que inmediatamente se descompone en agua para formar maltobionato. El proceso genera peróxido de hidrógeno. El esquema de reacción neta puede ser descrito como:



60 [0023] Varias oxidasas de carbohidrato adecuadas capaces de convertir maltosa en maltobionato, se conocen y están disponibles para el experto en la materia. Ejemplos de tales carbohidrato oxidasas son aldosa oxidasa, celobiosa oxidasa (EC 1.1.99.18), piranosa oxidasa (EC1.1.3.10), y hexosa oxidasa (EC1.1.3.5). Estudiando EC 1.1.3.\_, EC 1.2.3.\_, EC 1.4.3.\_, y EC 1.5.3\_ o clases de enzimas similares con base en las recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB), otros ejemplos de carbohidrato oxidasas útiles son fácilmente reconocidos por un experto en la técnica.

65 [0024] Una carbohidrato oxidasa preferida es una carbohidrato oxidasa microbiana, en particular una carbohidrato

oxidasa aislada.

[0025] La hexosa oxidasa (EC1.1.3.5) es una carbohidrato oxidasa capaz de oxidar diferentes sacáridos incluyendo glucosa, galactosa, maltosa, celobiosa y lactosa. Enzimas de la clase de las hexosa oxidasas son enzimas preferidas en la presente invención. Las hexosa oxidasas se producen naturalmente por diferentes especies algales marinas. Tales especies son por ejemplo encontradas en la familia *Gigartinaceae* que pertenecen al orden *Gigartinales*. Ejemplos de especies algales de producción de hexosa oxidasa de *Gigartinaceae* son *Chondrus crispus* e *Iridophycus flacci*. También especies algales del orden *Cryptomentales* incluyendo las especies *Euthora cristata* son fuentes potenciales de la hexosa oxidasa adecuadas para el uso en la presente invención. En particular, las hexosa oxidasas adecuadas para el uso en la presente invención son por ejemplo extraídas del alga roja *Iridophycus flaccidum* (Bean y Hassid, 1956, J Biol Chem 218: 425-436) o extraídas de *Chondrus crispus*, o *Euthora cristata* como se describe en WO96/40935, que además describe la clonación y expresión recombinante de la hexosa oxidasa de *Chondrus crispus* mostrada como SEC ID NOS 30 y 31 en WO96/40935. La celobiosa oxidasa (EC 1.1.99.18) es una carbohidrato oxidasa capaz de oxidar varios sacáridos incluyendo celobiosa, celooligosacáridos solubles, lactosa, xilobiosa y maltosa. Enzimas pertenecientes a la clase de las celobiosa oxidasas son también enzimas preferidas en la presente invención. La celobiosa oxidasa es una enzima extracelular producida por varios hongos de degradación de madera, tal como el hongo *Phanerochaete chrysosporium* de pudrición blanca, hongo de pudrición marrón *Coniofora Puteana* y hongos de pudrición blanda tal como *Monilia sp.*, *Chaetomium cellulolyticum*, *Myceliophthora (Sporotrichum) thermophila*, *Sclerotium rolfsii* y *Humicola insolens* (Schou et al., 1998, Biochemical Journal 330: 565-571).

[0026] Otras carbohidrato oxidasas adecuadas pueden ser derivadas, por ejemplo de un *Pyrenomyces* mitospórico tal como *Acremonium*, en particular, *A. strictum* depositado bajo ATCC 34717 o *A. strictum* T1 (Lin et al., 1991, Biochimica et Biophysica Acta 1118: 41-47); *A. fusidioides* depositado bajo IFO 6813 o *A. potronii* depositado bajo IFO 31197. En una forma de realización preferida, la carbohidrato oxidasa se obtiene de la fuente descrita en (Lin et al., 1991, Biochimica et Biophysica Acta 1118: 41-47) al igual que en JP5084074.

[0027] En otra forma de realización preferida la carbohidrato oxidasa es una carbohidrato oxidasa obtenida de un hongo del género *Microdochium*, más preferiblemente donde el hongo es *Microdochium nivale* e incluso más preferiblemente donde el hongo es el *Microdochium nivale* depositado bajo CBS 100236. La oxidasa aislada de CBS 100236 es descrita en detalle en WO 99/31990.

[0028] La generación de maltobionato por fermentación de bacterias del género *Pseudomonas* que crecen en un sustrato con maltosa ha sido descrita previamente (US 2,496,297, US 3,862,005, US 3,899,604 y EP384534). Es también posible usar deshidrogenasas con la presente invención. Tales sistemas de enzima deshidrogenasa se pueden aislar de *Pseudomonas*, en particular de *P. ovalis*, *P. schuilkilliensis*, *P. graveolens* (p. ej. depositado bajo IFO 3460), *P. fragi*, *P. iodinum*, *P. amiloderamosa* (p. ej. depositado bajo ATCC 21262) o *P. cepacia* (p. ej. depositado bajo CBS 659.88 o CBS 658.88).

[0029] La cantidad de oxidasa/deshidrogenasa para ser usada generalmente dependerá de los requisitos específicos y de la enzima específica. La cantidad de adición de oxidasa es preferiblemente suficiente para generar el grado deseado de conversión de maltosa en maltobionato dentro de un tiempo específico. Típicamente, una adición de oxidasa en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 10000 OXU por kg de sustrato es suficiente, particularmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 5000 OXU por kg de sustrato, y más particularmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 OXU por kg de sustrato. El conocimiento general del experto en la materia incluirá ajustar la cantidad de enzima específica necesitada para la conversión de maltosa en maltobionato.

[0030] En la literatura, una Unidad de Oxidasa (OXU) es normalmente definida como la cantidad de enzima que oxida un  $\mu\text{mol}$  de maltosa por minuto bajo condiciones específicas. No obstante, en los ejemplos proporcionados aquí OXU se define como un mg de enzima oxidasa pura - según se mide con respecto a una enzima estándar.

[0031] En otro aspecto de la presente invención, el maltobionato se produce por una reacción catalizada de dos enzimas. La primera reacción forma maltosa a partir de los componentes de almidón presentes durante la producción del alimento o de pienso, usando una enzima amilasa. La segunda reacción es oxidar la maltosa a maltobionato como se describe en el aspecto anterior. Las dos reacciones pueden ser hechas simultáneamente o consecutivamente. En una forma de realización preferida la reacción de amilasa se hace primero seguido de la reacción de maltosa a maltobionato.

[0032] La amilasa es capaz de hidrolizar almidón para formar oligosacáridos como un producto principal, en particular maltosa, un proceso que es bien conocido por el experto en la materia. La amilasa se puede derivar de una bacteria o un hongo, en particular de una cepa de *Aspergillus*, preferiblemente una cepa de *A. niger* o *A. oryzae*, o de una cepa de *Bacillus*. Algunos ejemplos son alfa-amilasa, por ejemplo de *Bacillus amyloliquefaciens*, y amiloglucosidasa, por ejemplo de *A. niger*. Productos comerciales incluyen BAN y AMG (productos de Novo Nordisk A/S, Dinamarca), Grindamyl A 1000 o A 5000 (disponible de Grindsted Products, Dinamarca) y amilasa H y amilasa P (productos de Gist-Brocades, Países Bajos). La beta-amilasa, u otras enzimas degradadoras de almidón que dan como resultado la formación de maltosa, pueden asimismo ser usadas.

[0033] En un aspecto adicional de la invención se añade la catalasa (EC 1.11.1.6) para prevenir la limitación de la reacción llevada a cabo por la carbohidrato oxidasa y eliminar  $H_2 O_2$  indeseado en el producto final. Una catalasa es una enzima que cataliza la reacción:  $2 H_2 O_2 \rightarrow 2 H_2 O$  (ecuación 2).

5 [0034] Como se ha descrito anteriormente la carbohidrato oxidasa depende de oxígeno, pero produce peróxido de hidrógeno. La ventaja de añadir catalasa al proceso de la presente invención es que la carbohidrato oxidasa dispone de oxígeno y al mismo tiempo es el peróxido de hidrógeno que tiene fuertes propiedades de oxidación eliminadas. Esto es particularmente pertinente si el maltobionato es producido como una parte integrada del proceso de producción del alimento o de pienso.

10 [0035] Varias catalasas adecuadas se conocen por el experto en la materia, por ejemplo, la catalasa disponible comercialmente, Catzyme® de Novozymes A/S.

Producción

15 [0036] La producción de maltobionato por fermentación por ejemplo usando bacterias del género *Pseudomonas* que crecen en un sustrato con maltosa es generalmente conocida en la técnica (US 2,496,297, US 3,862,005, US 3,899,604 y EP384534). Adicionalmente, WO 99/31990 describe la oxidación de maltosa pura en maltobionato usando carbohidrato oxidasa.

20 [0037] Un aspecto de la invención se refiere a la producción de maltobionato, procesando la maltosa naturalmente presente en la producción de cerveza. El proceso para producir maltobionato comprende las siguientes etapas:

a) obtener una maltosa con sustrato aplicable en un proceso de producción de mosto o trituration;  
 b) convertir la maltosa en maltobionato por una reacción enzimática, donde el maltobionato se forma durante un sub-proceso en una producción de cerveza. La reacción enzimática en la fase b) se cataliza por una oxidorreductasa/deshidrogenasa, preferiblemente por una de las carbohidrato oxidasas, descrita anteriormente incluso más preferido por una de las hexosa oxidasas anteriormente descritas y las más preferidas por la carbohidrato oxidasa obtenible de *Microdochium nivale* depositada bajo CBS 100236. El proceso descrito produce una conversión casi completa de maltosa en maltobionato, preferiblemente 80%, más preferiblemente 85%, más preferiblemente 90%, incluso más preferido 95%, lo más preferido 99%, e incluso lo más preferido 100% de maltosa en el sustrato se convierte en maltobionato.

35 [0038] Una ventaja de este proceso es que los componentes usados son los que se usan en la producción de cerveza de todos modos, por lo tanto el maltobionato no está derivado de ningún aditivo. Preferiblemente, la fracción que contiene maltosa comprende entre 5% y 60%, más preferiblemente entre 10% y 40%, incluso más preferiblemente entre 15% y 30%, incluso más preferiblemente entre 20% y 25% de maltosa. Una ventaja adicional del proceso descrito es que los otros componentes del producto de cerveza no están complicando el proceso.

40 [0039] Las complicaciones del proceso de otros componentes pueden por ejemplo ser la formación de espuma ya que la reacción de carbohidrato oxidasa puede requerir la adición de oxígeno a la mezcla reactiva, que puede crear espuma en las mezclas que contienen la proteína.

[0040] El sustrato que comprende maltosa se obtiene a partir de la elaboración de cerveza,

45 [0041] En el proceso de elaboración de cerveza la maltosa está naturalmente presente, puesto que el proceso de trituration produce maltosa para la fermentación. En particular el mosto tiene alto contenido en maltosa.

50 [0042] El proceso para la producción de maltobionato debe ser realizado bajo condiciones que permiten a la carbohidrato oxidasa convertir maltosa en maltobionato. Tales condiciones incluyen, pero de forma no limitativa, temperatura, pH, oxígeno, cantidad y características de carbohidrato oxidasa, otros aditivos tales como por ejemplo catalasa y tiempo de reacción/incubación.

55 [0043] Un período de incubación adecuado debería permitir el grado de conversión de maltosa en maltobionato de interés. Generalmente, un período de incubación adecuado se selecciona en el intervalo de ½ hora a 3 días, preferiblemente, de 2 horas a 48 horas, más preferiblemente de 5 horas a 24 horas, de la forma más preferible de 8 horas a 18 horas.

60 [0044] El oxígeno es un factor importante ya que la conversión de maltosa en maltobionato consume oxígeno (ver ecuación 1 más arriba). Por consiguiente, si el oxígeno se monitorea durante la reacción enzimática uno generalmente observará una caída inicial en la cantidad de oxígeno, que, si por ejemplo se proporciona aire constantemente, volverá a alrededor del nivel inicial, cuando la reacción enzimática termine. Cuando el oxígeno vuelve a más del 90% del nivel inicial la reacción enzimática ha cesado o al menos se ha ralentizado significativamente, indicando que todo el sustrato (p. ej. almidón, dextrina y/o maltosa) ha sido procesado a maltobionato. Por consiguiente, un período de incubación adecuado podría preferiblemente ser un tiempo que al menos dura hasta que el nivel de oxígeno en el lote de producción ha retornado a más del 90% del nivel inicial, especialmente si se desea una conversión máxima de maltosa.

Alternativamente, la reacción se puede monitorear por la cantidad de base requerida para tener el pH constante. Cuando la cantidad de base necesitada para mantener el pH se reduce es una indicación de que la reacción ha cesado o al menos se ha ralentizado significativamente. Un declive en la reacción enzimática puede, no obstante, no sólo deberse al agotamiento del sustrato. La estabilidad enzimática sobre el tiempo es también un parámetro que puede afectar a la reacción. Consecuentemente, si la enzima está degradándose en el tiempo esto puede también causar que la reacción sea ralentizada. En este caso la adición de sustrato no supondría una reducción renovada en el oxígeno y pH.

[0045] Fuentes adecuadas de oxígeno incluyen aire atmosférico (aprox. 20% oxígeno), aire atmosférico enriquecido con oxígeno (contenido de oxígeno > 20%) y oxígeno puro. Ejecutar el proceso bajo una presión superior a 1 atmósfera aumenta la solubilidad de oxígeno y puede ser preferido en cualquier lugar donde sea aplicable. El oxígeno se puede suministrar al proceso, por ejemplo mezclando continuamente aire en la mezcla reactiva durante la incubación.

[0046] Una opción alternativa para suministrar O<sub>2</sub> es añadir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la presencia de catalasa (ver ecuación 2 más arriba). Alternativamente, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido naturalmente por la carbohidrato oxidasa puede ser usado. El uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como una fuente de oxígeno puede ser particularmente preferido cuando el proceso se realiza usando enzimas inmovilizadas cuando la adición de oxígeno es más difícil, o cuando la formación de espuma, por ejemplo en la reacción que contiene la proteína, es un problema debido a la adición de oxígeno mezclando aire en la reacción. La catalasa se puede adicionar en cualquier tiempo adecuado por ejemplo con la carbohidrato oxidasa, o durante la reacción, cuando el nivel de O<sub>2</sub> se reduce, preferiblemente la catalasa se añade al principio de la incubación (tiempo = 0). Una ventaja de añadir una catalasa con la carbohidrato oxidasa es que la necesidad de oxígeno puede ser significativamente reducida (hasta un 50%). Así, el suministro de oxígeno, por ejemplo en forma de aire puede ser significativamente reducido. En realidad, añadiendo una cantidad adecuada de catalasa junto con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es posible omitir la suplementación de oxígeno completamente. Este H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extra-añadido puede originarse de cualquier fuente comercial.

[0047] Por consiguiente, se prefiere que esencialmente todo el oxígeno requerido para la oxidación de maltosa en maltobionato se obtenga por adición de una catalasa, que genera el oxígeno requerido por conversión del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disponible. Si la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está limitada al proceso, se puede añadir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicional.

[0048] En el presente contexto la expresión "esencialmente todo el oxígeno" se utiliza para describir el suministro de oxígeno necesitado para que la reacción enzimática funcione adecuadamente y en particular que no es necesario añadir activamente oxígeno extra durante el proceso. Preferiblemente, se añade catalasa en una cantidad que reduce la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en comparación con un proceso similar sin catalasa. Más preferiblemente, la cantidad de catalasa añadida al proceso como se describe en este caso, es una cantidad que es suficiente para obtener al menos 25%, 50%, 75%, 85% o 95% de reducción en la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en comparación con un proceso de control comparativo donde la única diferencia comparativa es que la catalasa no es añadida, incluso más preferiblemente la cantidad de catalasa añadida al proceso como se describe en este caso, es una cantidad que es suficiente para obtener un 100% de reducción en la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en comparación con un proceso de control comparativo donde la única diferencia comparativa es que no se añade catalasa. Preferiblemente, la catalasa se añade en una cantidad que también mejora el grado de conversión de maltosa en maltobionato.

[0049] La temperatura de incubación generalmente dependerá de la carbohidrato oxidasa usada y es típicamente seleccionada dependiendo de la temperatura de reacción óptima para la carbohidrato oxidasa. No obstante, como la solubilidad de oxígeno se reduce con el aumento de temperatura, se deben tener en cuenta otros factores para obtener un proceso óptimo. El experto en la materia sabrá ajustar la temperatura óptima respecto a por ejemplo la actividad enzimática y solubilidad del oxígeno. Generalmente, una temperatura adecuada estará en el intervalo de aproximadamente 0°C a aproximadamente 99 °C, más preferiblemente en el intervalo de 5°C a 90°C, incluso más preferiblemente en el intervalo de 15°C a 85°C, de la forma más preferible en el intervalo de 25°C a 80°C, incluso de la forma más preferible en el intervalo de 30°C a 60 °C.

[0050] El pH óptimo puede variar dependiendo de la carbohidrato oxidasa usada. No obstante, el análisis cinético de la carbohidrato oxidasa de *Microdochium nivale* (Nordkvist et al., 2007, Biotechnol Bioeng 97: 694-707) indica que el uso de bases fuertes (NaOH) puede afectar a la estabilidad de las carbohidrato oxidasas. Además, WO 97/004082 describe que rendimientos aumentados de lactobionato usando carbohidrato oxidasa se pueden obtener cuando el proceso se realiza a un pH estable. Por consiguiente, para aumentar el rendimiento de maltobionato del presente proceso se puede desear mantener el pH durante la conversión de maltosa en maltobionato (paso iii, más arriba), por adición adecuada de una base, a un nivel estable. En formas de realización específicas el nivel de pH estable se mantiene en el intervalo de aproximadamente 3.0 a aproximadamente 9.0 por adición de una base. Es posible mantener el pH en los intervalos prescritos usando cualquier base. En principio, cualquier sustancia capaz de neutralizar el ácido producido será aplicable en el proceso. El experto en la materia conoce numerosas bases que se pueden aplicar en el proceso de la invención, por ejemplo bases fuertes tales como Ca(OH)<sub>2</sub>, hidróxido de potasio, NaOH y Mg(OH)<sub>2</sub>. En una forma de realización preferida una base débil o carbonato se utiliza para mantener el pH a un nivel estable. Ejemplos de bases débiles incluyen, pero de forma no limitativa, CaCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y NH<sub>4</sub>OH. Actualmente, las bases débiles preferidas son NH<sub>4</sub>OH y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

[0051] El valor de pH estable preferido para un proceso específico de interés, como será apreciado por el experto en la

5 materia, dependerá de varios factores. Por ejemplo, si el producto alimenticio es cerveza, el pH de producción del mosto es conocido por ser alrededor de 5.0 a 5.7, preferiblemente alrededor de 5.1 a 5.3. Así, será preferido mantener el pH a un nivel estable alrededor de 5.3, tal como de pH 5.0 a 5.6. Intervalo de pH preferidos para otros productos alimenticios/piensos pueden estar en el intervalo de pH 3.0 a 4.0, por ejemplo para zumo o refrescos como cola, o en el intervalo de 4.0 a 5.0, por ejemplo cerveza o mayonesa o preparaciones, o en el intervalo de 5.6 a 6.5, por ejemplo productos de carne o en el intervalo de 6.6 a 7.5 productos lácteos y de huevo.

10 [0052] Será apreciado que el pH del producto o composición de maltobionato comprendiendo maltobionato puede también ser ajustado a un nivel de pH preferido después o al final de la conversión enzimática realizada, por ejemplo cuando el 95% de la conversión deseada de maltosa ha sido conseguida, se puede permitir que el pH caiga a un nivel deseado.

15 [0053] En el presente contexto "un nivel de pH estable" debe ser entendido de forma general como el control y mantenimiento del pH durante el proceso dentro de un intervalo específico, o cercano a un valor específico por adición de una base. Control y ajuste/mantenimiento de pH durante un proceso enzimático es un procedimiento estándar que puede llevarse a cabo con un grado de precisión muy alto. Así, un pH estable puede ser un valor mantenido a un nivel constante con una variación inferior a 1.5 unidades de pH, preferiblemente menos que 1.0 unidades de pH, más preferido menos que 0.5 unidades de pH, más preferido menos que 0.3 unidades de pH, incluso más preferido menos que 0.2 o 0.1 unidades de pH. De ello se deduce que un intervalo óptimo se puede definir para un proceso específico enzimático según la presente invención y que el pH se puede controlar y mantener con el grado de precisión descrito dentro de este intervalo. En el proceso de la invención, un intervalo de pH adecuado específico o valor de pH específico se selecciona en el intervalo de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 9.

25 [0054] Se prefiere que el pH se mantenga al nivel de pH estable como se describe en este caso desde el inicio de la reacción enzimática. En otras palabras, inmediatamente después de que se añada la oxidasa al producto que contiene maltosa se añade la base para mantener el pH estable como se describe en este caso.

30 [0055] Particularmente, si se desea una conversión máxima de maltosa el pH se mantiene al nivel estable como se describe en este caso para un periodo temporal que al menos dura hasta que el nivel de oxígeno de la mezcla reactiva ha retornado a más del 90% del nivel inicial, o la cantidad de base usada para mantener el pH constante corresponde al grado deseado de conversión.

35 [0056] Preferiblemente, el pH se mantiene al nivel de pH estable como se describe en este caso para un período de tiempo de 30 minutos a 3 días, preferiblemente, de 2 horas a 48 horas, más preferiblemente de 5 horas a 24 horas, de la forma más preferible de 8 horas a 18 horas.

40 [0057] En una forma de realización particular de la presente invención la conversión de maltosa en maltobionato se hace en un lote de mosto obtenido de un proceso de trituración. El mosto conteniendo maltobionato se puede usar como ingrediente para una serie de lotes de mosto para la producción de cerveza.

[0058] La conversión de almidón en maltosa en maltobionato se hace en un lote de trituración antes del proceso de trituración. El proceso puede incluir la adición de amilasa junto con carbohidrato oxidasa. La trituración que contiene maltobionato se puede usar como ingrediente en una serie de procesos de trituración.

45 [0059] Un aspecto específico se refiere a un proceso para obtener un rendimiento aumentado y/o un tiempo de reacción reducido en la conversión enzimática de maltosa en maltobionato. El proceso se define por las etapas de:  
 i) añadir una carbohidrato oxidasa a un sustrato que comprende maltosa;  
 ii) incubar el sustrato bajo condiciones que permiten que la carbohidrato oxidasa convierta la maltosa en maltobionato; y  
 50 iii) mantener el pH durante la etapa ii) en el intervalo de aproximadamente 3.0 a aproximadamente 9.0 por adición de una base.

[0060] Obviamente, los procesos descritos en la presente invención son útiles para un proceso de fabricación industrial para la producción de un producto de cerveza donde la maltosa está naturalmente presente durante la producción.

55 [0061] La presente invención se refiere a la producción de maltobionato directamente (in situ) en un proceso de producción de cerveza procesando la maltosa que está naturalmente presente en el proceso. Consecuentemente, el maltobionato se forma durante la producción de cerveza como tal, y no en una reacción separada. El proceso para producir maltobionato, donde se integra el proceso en el proceso de producción de cerveza comprende las etapas siguientes:

60 i) añadir unas oxidorreductasas o deshidrogenasas, preferiblemente una carbohidrato oxidasa, a un proceso de producción de cerveza;  
 ii) mantener el proceso bajo condiciones que permiten la conversión enzimática de maltosa en maltobionato;  
 iii) proceder con el proceso de producción de cerveza.

65 [0062] La reacción enzimática en la etapa i) puede ser precedida por una reacción de degradación de almidón, por ejemplo catalizada por una amilasa, que bien se puede proporcionar endógenamente (p. ej. de la malta ya presente en

el proceso) o exógenamente (p. ej. por adición antes de o junto con la enzima de la etapa i). La carbohidrato oxidasa y las condiciones que permiten la conversión enzimática son esencialmente las mismas que se han descrito anteriormente. Con respecto a la temperatura óptima se debería, no obstante, considerar que la reacción se debe ejecutar en un proceso de producción de cerveza. Consecuentemente, será una ventaja que la carbohidrato oxidasa pueda funcionar a las temperaturas óptimas para este tipo de proceso.

[0063] La ventaja de generar maltobionato directamente durante el proceso de producción de cerveza es que una vez que el proceso ha sido optimizado, las etapas de producción separadas para la generación de maltobionato se vuelven superfluas.

[0064] En la presente invención, el maltobionato se genera durante un sub-proceso en la producción de cerveza, tal como el proceso de trituración o proceso de fermentación, por adición de la carbohidrato oxidasa y potencialmente la catalasa al sub-proceso. La conversión de maltosa en maltobionato puede tener lugar en la trituración (malta molida + fluido) antes de la trituración, o durante el proceso de trituración o después de la cocción del mosto antes de la fermentación, o incluso durante la fermentación. Ésta última, no obstante, requiere enzimas aptas para la alimentación. La presencia de maltosa en el mosto es, no obstante, necesitada para la fermentación del mosto en la cerveza. Por lo tanto, la conversión de maltosa en maltobionato debe ser optimizada de manera que la maltosa sólo se convierte parcialmente en maltobionato. Preferiblemente, el mosto contiene hasta 2% de maltosa, más preferido hasta 5 % de maltosa, y lo más preferido hasta 10% de maltosa.

[0065] El proceso de trituración generalmente aplica un aumento controlado gradualmente de temperatura, donde cada etapa favorece una acción enzimática sobre la otra, finalmente degradando proteínas, membranas celulares y almidón. Los perfiles de temperatura de trituración son generalmente conocidas en la técnica. En la presente invención la conversión de maltosa en maltobionato ocurre preferiblemente en relación con el paso de sacarificación (degradación de almidón) entre 55°C y 66°C. En una forma de realización preferida la carbohidrato oxidasa está activa en este intervalo de temperatura. Alternativamente, el proceso de trituración puede mantenerse a una temperatura inferior suficientemente largo para permitir la conversión de almidón en maltosa en maltobionato a una temperatura donde la carbohidrato oxidasa está activa. La amilasa se puede añadir exógenamente en esta etapa para facilitar la conversión de almidón en maltosa.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Producción de maltobionato.

[0066] El maltobionato de Na fue producido a partir de maltosa por oxidación catalizada por una carbohidrato oxidasa (M. Nivale CBS 100236 como se describe en WO99/31990) y catalasa (Catazyme 25L, Novozymes, Dinamarca). Las dosificaciones enzimáticas fueron: carbohidrato oxidasa 400 mg de proteína enzimática/kg de maltosa y, catalasa 6 g/kg de maltosa. La maltosa fue disuelta en una concentración del 10%, a 38°C. Un reactor agitado con 3 L de solución fue usado para la reacción. Durante la reacción, el aire atmosférico fue añadido a 1 L/minuto y el pH fue mantenido constante a 6.4 por adición continua de 1 M de solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. El tiempo de reacción total fue 17 horas. Esencialmente toda la maltosa fue convertida en ácido maltobiónico durante la reacción.

### Ejemplo 2

Efecto antioxidante de maltobionato medido por el ensayo del poder antioxidante reductor de hierro (FRAP).

[0067] En resumen el ensayo FRAP funciona de la siguiente manera: el complejo Fe<sup>3+</sup>-tripiridiltriazina (TPTZ) se reduce a Fe<sup>2+</sup>-TPTZ a bajo pH. La forma del hierro (Fe<sup>2+</sup>) es de color azul y se puede medir espectro-fotométricamente a 593 nm. El método se calibra con concentraciones conocidas de soluciones de Fe<sup>2+</sup>. Cuanto más alta es la absorbencia más alto es el estado antioxidante.

[0068] Para el ensayo FRAP un reactivo de trabajo fue obtenido a partir de los siguientes componentes:

Tampón de acetato: 3.1 g de CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O y 16 mL de CH<sub>3</sub>COOH conc. en ≈ 800mL agua.

Controlar que el pH es 3.6. En caso contrario, ajustar con NaOH/CH<sub>3</sub>COOH. Añadir agua a 1 L.

Solución de TPTZ: 10mmol/L 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) en 40mmol/L HCl

Solución de Fe(III): 20 mM Fe(III)Cl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O.

[0069] Reactivo de trabajo (preparado a diario): 50 mL de tampón de acetato + 5.0 mL de solución de TPTZ + 5.0 mL de solución de Fe(III)

[0070] El ensayo fue realizado añadiendo 50  $\mu\text{L}$  de muestra/standard/blanco a 1.5 mL de reactivo de trabajo en 2 mL de tubos Eppendorf oscuros seguido de incubación en termomezclador a 37°C durante 30 min. Las muestras consisten en maltobionato en diferentes concentraciones, los estándares contienen  $\text{Fe}^{2+}$  y ácido ascórbico, y los blancos fueron muestras de agua. El ensayo fue realizado por triplicado. La absorbencia fue leída inmediatamente a 593 nm, cuanto más alta es la absorbencia más alto es el estado antioxidante ( $\uparrow\text{Abs}\rightarrow$ , antioxidante $\uparrow$ ). Los resultados se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: Maltobionato de sodio en FRAP (g/L) Abs a 593 nm

<b>Maltobionato de sodio (concentrados líquidos)</b>		
	promedio de Abs	Std. Dev.
5%	0.236	0.021
2, 50%	0.170	0.002
1%	0.112	0.006
Blanco	0.0257	0.00058

10 El maltobionato muestra capacidad antioxidante en cuanto a reducir  $\text{Fe(III)}$  y así crear un cambio en la absorbencia debido al complejo de tripiridiltriazina ferrosa. El ensayo mostró un claro efecto de respuesta a la dosis del antioxidante.

## Ejemplo 3

15 Efecto antioxidante de carbohidrato oxidasa y/o catalasa en el mosto de cerveza.

[0071] Mosto de cerveza fue producido a partir de malta de cebada bien modificado 50g en 250g de agua a 53 °C. La malta de cebada fue molida usando un perfil de temperatura que consiste en 30 min a 52 °C, aumento de 1°C/min durante 11 min, 63 °C durante 30 min, aumento de 1 °C/min durante 9 min, 72°C durante 30 min, aumento de 1 °C/min durante 6 min, 78°C durante 15 min, seguido de enfriamiento a 20°C.

[0072] Una serie de experimentos con adición de carbohidrato oxidasa y/o catalasa al mosto fueron hechos y comparados con una muestra de control. Las enzimas fueron adicionadas antes de la etapa de trituración. La carbohidrato oxidasa fue dosificada según la actividad medida como LOXU donde una LOXU corresponde a 1 mg de proteína enzimática. La catalasa fue dosificada según la actividad medida como CIU. 1 CIU es la cantidad de enzima que descompone 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto a  $\text{pH} = 7.0$  y  $T = 25$  °C

[0073] Para medir la capacidad antioxidante de la carbohidrato oxidasa y/o catalasa, 1mM de  $\text{Fe}^{2+}$  se añadió a todas las muestras. La oxidación fue medida indirectamente usando un ensayo de complejo de naranja de xilenol (ensayo XO). En este ensayo, hidroperóxido en el mosto oxida  $\text{Fe}^{2+}$  en el complejo de naranja de xilenol a  $\text{Fe}^{3+}$  que forma un complejo con naranja de xilenol. El complejo oxidado puede ser medido espectrofotométricamente, cuanto más baja es la absorbencia más alto es el estado antioxidante ( $\downarrow\text{abs}\rightarrow$  antioxidante $\uparrow$ ).

[0074] El reactivo de trabajo de XO fue obtenido a partir de los siguientes componentes:  
 35 A: 2.5 mM de hexahidrato de sulfato ferroso de amonio, 1.0 mM (XO) de sal tetrasódica de naranja de Xilenol en 1250mM de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
 B: 4.89 mM de hidroxitolueno butilado (BHT) en metanol.  
 Reactivo de trabajo de XO: mezclar 1 parte A con 9 partes B. Estabilizar 1 mes en la nevera si se mantiene en una botella oscura.

40 [0075] El ensayo fue iniciado añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de muestra a 900  $\mu\text{L}$  de reactivo de trabajo de XO. La incubación fue realizada a temperatura ambiente durante 30 min con agitación. Cada muestra fue centrifugada a 14000 r.p.m. a 20°C durante 10 minutos. La absorción del sobrenadante fue medida espectrofotométricamente a 560nm.

45 [0076] La absorbencia aumentó en todas las muestras debido a un aumento en el complejo de XO teñido con  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  oxidado. Las muestras de mosto con 50 LOXU impide la formación de oxidación comparado con el control(abs = 0.410 control y 0.257 para el 50LOXU). El efecto es pobre en la mitad de la dosificación 25 LOXU (ABS = 0.421), no obstante mejora por combinación de 600 CIU de catalasa (abs = 0.308). 1200 CIU de catalasa también impide la formación de complejo teñido (abs = 0.264) y el efecto en la dosificación dependió de que 600 CIU fuera difícilmente  
 50 diferente (abs = 0.439) del control.

**REIVINDICACIONES**

1. Proceso para producir maltobionato comprendiendo las etapas siguientes:
  - 5 a) obtener una maltosa con sustrato aplicable en un proceso de producción de mosto o de trituración; y
  - b) convertir la maltosa en maltobionato por una reacción enzimática, donde el maltobionato se forma durante un sub-proceso en una producción de cerveza.
- 10 2. Proceso según la reivindicación 1, donde la reacción enzimática en la fase b) según la reivindicación 1 se cataliza por una oxidorreductasa.
3. Proceso según la reivindicación 2, donde la oxidorreductasa es una carbohidrato oxidasa.
- 15 4. Proceso según la reivindicación 3, donde la carbohidrato oxidasa se selecciona de hexosa oxidasa, celobiosa oxidasa, aldosa oxidasa y piranosa oxidasa.
5. Proceso según la reivindicación 3, donde la carbohidrato oxidasa es obtenible de *Microdochium nivale* depositada bajo CBS 100236.
- 20 6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde una catalasa se añade al proceso.
7. Proceso según la reivindicación 6, donde la catalasa se añade a la reacción enzimática de la etapa b) según la reivindicación 1.
- 25 8. Proceso según la reivindicación 1, donde el sub-proceso es el proceso de trituración.
9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la etapa b) según la reivindicación 1 se mantiene a un nivel de pH estable por adición de una base durante el proceso.