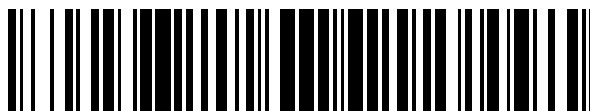


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 776**

51 Int. Cl.:

C12N 11/08 (2006.01)

C12N 9/62 (2006.01)

C12C 5/00 (2006.01)

C12H 1/00 (2006.01)

C12C 11/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2014** **PCT/EP2014/061305**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014** **WO14191571**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2014** **E 14727506 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018** **EP 3004344**

54 Título: **Endoproteasa específica de prolina inmovilizada**

30 Prioridad:

31.05.2013 EP 13170062

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

13.12.2018

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

Het Overloon, 1

6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

HISENI, AIDA;

GALAEV, IGOR y

EDENS, LUPPO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 693 776 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

Endoproteasa específica de prolina inmovilizada.

La presente invención se refiere a endoproteasa específica de prolina inmovilizada y un proceso para preparar cerveza en el que se usa la endoproteasa específica de prolina inmovilizada.

5 Antecedentes

Las endoproteasas específicas de prolina son enzimas que pueden derivarse de bacterias y hongos, por ejemplo, endoproteasa específica de prolina procedente de *Aspergillus niger* como se describe en el documento WO2002/046381. Las endoproteasas específicas de prolina son capaces de escindir una proteína en lugares donde la proteína contiene un residuo prolilo en su cadena. El documento WO2002/046381 describe que dicha endoproteasa específica de prolina puede usarse para reducir la turbidez en una bebida tal como cerveza. La turbidez en la cerveza consiste principalmente en agregados de proteína-polifenol. Para reducir la turbidez, la endoproteasa específica de prolina puede añadirse al mosto de cerveza, durante la fermentación o durante una fase de estabilización de la cerveza.

El documento WO2005/027953 describe que la endoproteasa específica de prolina redujo los niveles de gluten en la cerveza cuando se añadió endoproteasa específica de prolina durante la maceración o fermentación de la cerveza.

Para ser capaces de reutilizar la endoproteasa específica de prolina en por ejemplo un proceso de producción de cerveza, se sugería en el documento WO2003/104382 inmovilizar la enzima y minimizar el riesgo de que la enzima permanezca presente en el producto final.

La inmovilización de enzimas se conoce desde hace décadas (véase "Immobilization of Enzyme and Cells", segunda edición, editado por José M. Guisán, 2006, Humana Press Inc.). Los procedimientos más comunes de inmovilización de enzimas son el acoplamiento covalente, atrapamiento, micro-encapsulado y reticulado.

Sin embargo, no se ha descrito una inmovilización adecuada para la endoproteasa específica de prolina en la que la enzima permanezca activa en sustratos parcialmente o enteramente insolubles, tales como agregados de proteína-polifenol que forman turbidez en la cerveza, o gluten.

El objetivo de la presente invención es una endoproteasa específica de prolina inmovilizada que sea suficientemente activa en sustratos insolubles.

Compendio

La presente descripción se refiere a una endoproteasa inmovilizada específica de prolina inmovilizada mediante reticulado o un vehículo que comprende metacrilato aminofuncionalizado que tiene un intervalo de tamaño de partícula de 100 a 400 μm . Sorprendentemente, se encontró que una endoproteasa específica de prolina inmovilizada como se describe en la presente memoria no solo permaneció su actividad enzimática en un sustrato grande tal como gluten, sino que también mostró una mayor actividad relativa a una menor temperatura en comparación con la actividad relativa de la enzima libre a esta menor temperatura.

La presente descripción también se refiere a un proceso para producir endoproteasa específica de prolina inmovilizada, que comprende activar el grupo amino en un vehículo de metacrilato funcionalizado con dimetileno con un agente de reticulado bifuncional, inmovilizar la endoproteasa específica de prolina en el vehículo de metacrilato amino-funcionalizado a una relación enzima: vehículo de 0,01 – 0,07 p/p, y producir la endoproteasa específica de prolina inmovilizada.

La presente descripción también se refiere a un proceso para producir cerveza, que comprende preparar un macerado, fermentar la cerveza, y estabilizar la cerveza, en el que la cerveza se incuba con endoproteasa específica de prolina inmovilizada.

Descripción detallada

Se describe en esta memoria una endoproteasa inmovilizada específica de prolina inmovilizada por reticulado en un vehículo que comprende polímero de metacrilato amino-funcionalizado. Preferiblemente la endoproteasa específica de prolina inmovilizada tiene un intervalo de tamaño de partícula de 100 a 400 μm . Preferiblemente, el vehículo que comprende polímero de metacrilato amino-funcionalizado puede tener un intervalo de tamaño de partícula de entre 150 a 350 μm . Preferiblemente, el polímero de metacrilato se ha amino-funcionalizado con dimetileno.

De forma ventajosa una endoproteasa específica de prolina inmovilizada como se describe en la presente memoria está inmovilizada en un vehículo que tiene una distribución de tamaño de poro d50 de 1500 – 2100 Å, por ejemplo, una distribución de tamaño de poro d50 de 1600 a 2000 Å. La distribución de tamaño de poro d50 es un término conocido para un experto en la técnica, y se define como el valor del diámetro de poro al 50% en la distribución acumulativa.

Normalmente, el vehículo de metacrilato amino-funcionalizado para inmovilizar endoproteasa específica de prolina tiene un área superficial mayor que 40 m²/g, tal como mayor que 45 m²/g, o mayor que 50 m²/g. El vehículo de metacrilato para inmovilizar endoproteasa específica de prolina normalmente tiene una retención de humedad de 58 a 70%, tal como 60 a 68%, o 62 a 66%. La retención de humedad se define en la presente memoria como la relación entre el peso del vehículo completamente hidratado y el peso del vehículo completamente seco.

Sorprendentemente, se encontró que una endoproteasa específica de prolina inmovilizada en un vehículo como se describe en la presente memoria permanece no solo activa en sustratos agregados poliméricos grandes y/o de proteína-polifenol tal como turbidez, por ejemplo, turbidez de cerveza, sino que fue capaz también de hidrolizar gluten, tal como gluten de cebada. Una enzima que tiene actividad endoproteasa específica de prolina que está inmovilizada en un vehículo como se describe en la presente memoria puede ser cualquier enzima adecuada capaz de escindir un péptido o proteína en los lugares donde la proteína o péptido contiene un residuo prolilo en su cadena. Una endoproteasa específica de prolina puede derivarse de un origen bacteriano o fúngico, tal como del género *Flavobacterium*, *Sphingomonas*, *Aeromonas*, *Xanthomonas*, *Bacteroides*, *Aspergillus* o *Penicillium*, por ejemplo, de *Flavobacterium meningosepticum*, *Sphingomonas capsulata*, *Aspergillus niger* o *Penicillium chrysogenum*. Una endoproteasa específica de prolina como se describe en la presente memoria pertenece a la clasificación enzimática EC 3.4.21.26. Una endoproteasa específica de prolina es preferiblemente una enzima que hidroliza un enlace peptídico en el extremo carboxi terminal de los residuos de prolina, dando por resultado un péptido y/o fragmento de polipéptido con una prolina C terminal.

La expresión inmovilizada se usa en la presente memoria para indicar que una enzima está unida a un vehículo, tal como un vehículo de metacrilato. La inmovilización de una enzima puede conseguirse reticulando la enzima en o al vehículo, que se conoce por un experto en la técnica (véase "Immobilization of Enzyme and Cells", Segunda edición, editado por José M. Guisán, 2006, Humana Press Inc.).

La presente descripción proporciona una endoproteasa específica de prolina inmovilizada mediante reticulado a un vehículo de metacrilato funcionalizado con dimetileno.

En una realización la presente descripción se refiere a un proceso para producir endoproteasa específica de prolina inmovilizada como se describe en la presente memoria, que comprende activar el grupo amino en un vehículo de metacrilato amino-funcionalizado con un agente de reticulado bifuncional, inmovilizar la endoproteasa específica de prolina en el vehículo y producir la endoproteasa específica de prolina inmovilizada.

Sorprendentemente, se encontró que usar un proceso para inmovilizar la endoproteasa específica de prolina como se describe en la presente memoria da por resultado una endoproteasa específica de prolina inmovilizada que tiene una mayor actividad relativa a una menor temperatura en comparación con la actividad relativa de la enzima libre.

El vehículo de metacrilato puede estar amino funcionalizado con un espaciador de dimetileno.

La activación del grupo amino en metacrilato amino-funcionalizado mediante un agente de reticulado bifuncional da por resultado la inmovilización de la enzima al vehículo. Preferiblemente, el agente de reticulado es glutaraldehído. La activación del grupo amino con glutaraldehído puede realizarse de cualquier forma adecuada que se conozca por un experto en la técnica.

Durante el proceso para la inmovilización de la enzima al vehículo, puede aplicarse cualquier relación enzima: vehículo adecuada tal como una relación de 0,01-0,07 p/p, o una relación enzima: vehículo de 0,02 a 0,06 p/p, o una relación enzima: vehículo de 0,03 a 0,05 p/p. Se encontró que a la relación enzima: vehículo indicada en un proceso para la inmovilización como se describe en la presente memoria se obtuvo una endoproteasa específica de prolina inmovilizada en un vehículo de metacrilato con actividad comparable como la enzima libre.

Preferiblemente, un proceso para inmovilizar endoproteasa específica de prolina como se describe en la presente memoria se realiza a temperatura de 10 a 50°C, tal como entre 15 a 40°C, tal como a una temperatura de entre 20 y 30°C.

Un proceso para inmovilizar endoproteasa específica de prolina como se describe en la presente memoria puede realizarse a cualquier pH adecuado, tal como un pH de entre 6 a 8, o un pH entre 6,5 y 7,5. Puede usarse cualquier tampón para mantener el pH a un nivel deseable, por ejemplo, un tampón que tiene una concentración de sal de entre 20 y 150 mM, o entre 40 y 120 mM, o entre 60 y 100 mM, tal como entre 70 y 90 mM. Un tampón adecuado puede ser por ejemplo un tampón fosfato.

Un proceso para inmovilizar endoproteasa específica de prolina como se describe en la presente memoria puede realizarse durante 4 a 48 h, tal como entre 8 y 36 h, o entre 10 y 24 h.

En una realización la presente descripción se refiere al uso de una endoproteasa específica de prolina inmovilizada como se describe en la presente memoria para la hidrólisis de gluten, tal como gluten de cebada.

El gluten es un grupo de proteínas ricas en prolina y glutamina que se encuentra en el trigo, centeno, cebada y avena, que puede subdividirse en gluteninas y prolaminas. Solo la fracción de prolamina del gluten da lugar a

reacciones alérgicas a la gente intolerante al gluten, y/o a la gente que sufre de enfermedad celíaca. Las prolaminas en los diferentes cereales están indicadas normalmente como gliadina en trigo, hordeina en la cebada, secalina en el centeno y avenina en las avenas. Para el propósito de la presente descripción la expresión gliadina puede usarse para indicar la fracción prolamina de todos los diferentes cereales.

- 5 En otra realización la presente descripción se refiere a un proceso para producir cerveza que comprende preparar un macerado, fermentar la cerveza y estabilizar la cerveza, en el que la cerveza se incuba con una endoproteasa específica de prolina inmovilizada como se describe en la presente memoria.

10 Cerveza se usa en la presente memoria para indicar un líquido durante cualquier etapa en el proceso de producción de cerveza. La cerveza puede ser o no ser un líquido listo para el consumo. La expresión cerveza también comprende mosto de cerveza o cerveza verde.

15 Hay muchos procesos diferentes para producir cerveza, que se conocen por un experto en la técnica. Normalmente un proceso de producción de cerveza comprende moler y macerar los cereales, tal como cebada, y el macerado resultante se filtra para dar mosto de cerveza. El mosto de cerveza se hierve entonces para inactivar todas las actividades enzimáticas residuales y posteriormente el mosto de cerveza se inocula con levadura. Fermentar la cerveza en un proceso según a la presente descripción comprende inocular el mosto de cerveza con levadura e incubar la levadura en el mosto de cerveza para fermentar los azúcares disponibles en alcohol. Esta fermentación se denomina también la fermentación primaria. La cerveza "verde" que resulta de esta fermentación primaria aún contiene algunas levaduras no depositada además de niveles relativamente altos de componentes aromáticos indeseables, notablemente dicetonas, tales como aldehído de diacetilo y acetilo.

20 La fermentación primaria se sigue por una fase de maduración, también denominada la fermentación secundaria. Fermentar cerveza en un proceso como se describe en la presente memoria puede comprender una fermentación primaria y secundaria. La fase de maduración pretende convertir los componentes aromáticos indeseables tales como dicetonas en componentes de mejor sabor.

25 Después de la maduración, la cerveza se estabiliza. La fase de estabilización pretende promover la formación de agregados de polifenol-proteína y permite su precipitación. Sorprendentemente se encontró que cuando la cerveza se incubó con una endoproteasa específica de prolina inmovilizada como se describe en la presente memoria la formación de agregados de polifenol-proteína se redujo o evitó. Además, se encontró que cuando la cerveza se incubó con una endoproteasa específica de prolina inmovilizada como se describe en la presente memoria, el contenido en gluten (gliadina) en la cerveza se redujo.

30 Por consiguiente, en una realización la presente descripción se refiere a un proceso para reducir el gluten en la cerveza, que comprende incubar cerveza con una endoproteasa específica de prolina inmovilizada, en el que la endoproteasa específica de prolina inmovilizada hidroliza al menos parte del gluten presente en la cerveza, y reduce el gluten en la cerveza. Por consiguiente, incubar endoproteasa específica de prolina inmovilizada en un proceso para producir cerveza comprende hidrolizar gluten.

35 Incubar cerveza con una endoproteasa específica de prolina inmovilizada puede realizarse en cualquier fase adecuada durante un proceso de producción de cerveza. Preferiblemente, incubar cerveza con endoproteasa específica de prolina inmovilizada se realiza durante una fase en la que la cerveza es un líquido claro. Por ejemplo, un proceso para producir cerveza comprende incubar endoproteasa específica de prolina inmovilizada durante o después de la fase de estabilización. Sin embargo, la endoproteasa específica de prolina inmovilizada puede añadirse también durante cualquier otra fase en el proceso de elaboración de cerveza y evitar o reducir la formación de turbidez, y/o hidrolizar gluten en fragmentos no tóxicos. Como se usa en la presente memoria, hidrolizar gluten en fragmentos no tóxicos, significa que la fracción de gliadina de gluten se hidroliza.

45 Preferiblemente, incubar una endoproteasa específica de prolina inmovilizada en un proceso para producir cerveza se realiza a una temperatura de entre -1 y 20°C, tal como una temperatura de entre 0 y 15°C, o una temperatura de entre 1 y 10°C, o una temperatura de entre 2 y 8°C. Sorprendentemente, se encontró que la endoproteasa específica de prolina inmovilizada fue capaz de hidrolizar gluten y reducir la turbidez en la cerveza a estas bajas temperaturas.

50 Incubar cerveza con una endoproteasa específica de prolina inmovilizada puede realizarse en modo de lotes o en modo continuo. Cuando se incuba endoproteasa específica de prolina se realiza en modo continuo, la endoproteasa específica de prolina inmovilizada puede empaquetarse en una columna que retiene la endoproteasa específica de prolina inmovilizada y permite a la cerveza fluir a través de la columna. Una columna adecuada puede comprender una criba en la parte superior y en la parte inferior de la columna. Dependiendo de la cantidad de material insoluble en la cerveza, la endoproteasa específica de prolina inmovilizada puede empaquetarse en una columna de lecho fluidizado o una columna de lecho empaquetado. La preparación de dicha columna se conoce por un experto en la técnica. Preferiblemente, la cerveza es un líquido claro cuando se pone en contacto con la endoproteasa específica de prolina inmovilizada.

55 Después de la estabilización la cerveza puede envasarse en una botella, lata o un barril. En otra realización la presente descripción se refiere al uso de una endoproteasa específica de prolina inmovilizada para la hidrólisis del

gluten. Preferiblemente, la endoproteasa específica de prolina inmovilizada se usa en un proceso para producir cerveza.

Figuras

Figura 1. Actividad de enzima de EndoPro inmovilizada en diferentes vehículos determinada con sustrato Ac-AAP-pNA. La actividad de la enzima se determina como el aumento de absorbancia a 405 nm en el tiempo (DO 405 nm/min).

Figura 2. Reducción de gliadina en el mosto de cerveza usando EndoPro inmovilizada y no inmovilizada.

Figura 3. Actividad relativa de EndoPro inmovilizada y no inmovilizada a 4°C en comparación con la actividad a 40°C (temperatura óptima).

10 Ejemplos

Materiales y métodos

Endoproteasa específica de prolina (EndoPro)

Endoproteasa específica de prolina de *Aspergillus niger* (EndoPro), se produjo fermentando una cepa de *A. niger* que contenía el gen que codifica la endoproteasa específica de prolina (GI: 21725363; núm. de acceso de proteína: AX458699) por métodos conocidos en la técnica. El caldo de fermentación obtenido después de la fermentación de una cepa de *Aspergillus niger* se sometió adicionalmente a ultrafiltración. La actividad específica de prolina en la muestra de EndoPro final fue 12,4 PPU/ml, y se determinó usando una N-carbobenzoxi-glicina-prolina-p-nitroanilida (Z-Gly-Pro-pNA) 2 mM en ácido cítrico 0,1 M/tampón de fosfato disódico 0,2 M pH 4,6, que contenía 40% de dioxano.

A 1 ml de este tampón a pH 4,6, se añadieron 250 µl de la disolución de sustrato seguido por 100 µl de la disolución de enzima. La mezcla de reacción se incubó a 37°C y la liberación de pNA liberada se midió de forma espectrofotométrica a 405 nm usando un espectrofotómetro Tecan Genios. La actividad se expresa en Unidades de Proteasa de Prolina (PPU). Una PPU se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de pNA desde Z-Gly-Pro-pNA en 1 minuto bajo las condiciones de ensayo descritas. Para calcular las concentraciones se usó un coeficiente de extinción molar de 10500 M⁻¹cm⁻¹.

La concentración de proteína se estimó que era 146 mg/g determinada usando el método Kjeldahl.

Vehículos de enzima

Los vehículos de enzima ECR Purolite se usaron para la inmovilización de EndoPro. Las propiedades principales de los vehículos se resumen en la Tabla 1.

30 Tabla 1. Propiedades del vehículo Purolite®

Nombre del vehículo	Retención de humedad (%)	Intervalo de tamaño de partícula (µm)	Área superficial (m ² /g)	d50, Meso y macrosporas (Å)	Espaciador
Purolite® ECR8310	58-62	150-300	>70	850-1200	dimetileno (C2)
Purolite® ECR8319	62-66	150-300	>50	1600-2000	dimetileno (C2)
Purolite® ECR8417	61-65	150-300	>50	1600-2200	hexametileno (C6)
Purolite® ECR8214	60-66	150-300	>60	1200-1800	epoxi

Determinación de nitrógeno total de determinación

El nitrógeno total (N) de la muestra se determinó usando el método Kjeldahl (*Bradstreet, Raymond B. "The Kjeldahl method for organic nitrogen." (1965)*). Las perlas con la enzima inmovilizada se secaron antes de la medida usando el Mettler Toledo HB43-S (Halogén). La proteína se calculó usando un factor de conversión de 6,25*N.

Determinación del contenido de gliadina en el mosto de cerveza

El contenido de gliadina se determinó como una medida para el contenido de gluten. La detección analítica de gliadinas en el mosto de cerveza se determinó con el kit ELISA competitivo con Gliadina RIDASCREEN® (R-Biopharm) según las instrucciones del fabricante. Este método se basa en el anticuerpo R5 (Méndez), que se

recomienda por el Codex Alimentarius (CODEX STAN 118-1979). El límite de cuantificación es 5 ppm de gliadina (= 10 ppm de gluten).

- 5 Generalmente, el contenido de gliadina puede convertirse en gluten multiplicando el contenido de gliadina con un factor 2. Sin embargo, este valor no es absoluto ya que la fracción de gliadina con respecto al gluten puede variar en la materia prima (Díaz-Amigo y Popping, Journal of AOAC International, Vol. 95, núm. 2, 2012).

Determinación del contenido de gliadina en cerveza

La detección analítica de gliadina en cerveza se determinó con el kit de gliadina RIDA®QUICK (R-Biopharm) según las instrucciones del fabricante. Este método se basa en el anticuerpo R5 (Méndez), que se recomienda por el Codex Alimentarius (CODEX STAN 118-1979). El límite de detección es 2,5 ppm de gliadina (= 5 ppm de gluten).

10 Ejemplo 1. Inmovilización de EndoPro en diferentes vehículos Purolite®

- Antes de la inmovilización de EndoPro, los vehículos Purolite® ECR8310, -8319 y -8417 se pre-activaron con glutaraldehído al 2% (v/v) en tampón K-fosfato 0,02M, pH 8,0 durante 1 h, seguido por lavado 3 veces del glutaraldehído no reaccionado con el mismo tampón. El vehículo ECR8214 Purolite no necesitó ninguna activación. Las perlas de ECR8214 solo se lavaron 3 veces con el mismo tampón y se usaron como tal. Finalmente, las perlas se filtraron usando un filtro de vidrio y las perlas semi-secas se almacenaron hasta el uso. Para la inmovilización, las perlas se mezclaron con tampón a una relación perlas/tampón de 1:10 (p/v) y se añadió EndoPro soluble a la mezcla de perlas/tampón a una carga enzimática como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de inmovilización. Se usó tampón de fosfato de potasio.

Nombre del vehículo	Carga enzimática (mg/g de vehículo)	Molaridad del tampón (mM)	pH del tampón
Purolite® ECR8310	80	35	5,8
Purolite® ECR8319	50	84	7
Purolite® ECR8417	50	84	7
Purolite® ECR8214	21	35	5,8

- 20 Después de agitación continua toda la noche a temperatura ambiente, las perlas se lavaron 3 veces con NaOAc 0,1M, pH 5,0. Finalmente, las perlas que contienen EndoPro inmovilizada se suspendieron en el mismo tampón y se almacenaron a 4°C.

Ejemplo 2. Actividad enzimática de EndoPro inmovilizada en 4 vehículos Purolite diferentes

- 25 La actividad de EndoPro se determinó como DO405 nm/min usando acetato-alanina-alanina-prolina-*p*-nitroanilina (Ac-AAP-*p*NA) como sustrato. La cantidad de *p*-nitroanilina (*p*NA) liberada formada en el tiempo es una medida de la actividad de EndoPro y se determinó de forma espectrofotométrica a 405 nm usando un espectrofotómetro Tecan GENios.

- 30 La EndoPro no inmovilizada o inmovilizada inmovilizada en uno de los 4 vehículos Purolite® se añadió a NaOAc 0,1M, pH 5,0, en una placa de microvaloración. Antes de la adición de las reservas de Ac-APP-*p*NA 3 mM (concentración final) en NaOAc 0,1M, pH 5,0, la enzima se incubó a 40°C durante 5 min. La medida cinética se comenzó y la actividad se calculó a partir de la pendiente de la curva. La actividad de la enzima se determina como el aumento de absorbancia a 405 nm en el tiempo (DO 405 nm/min) como un resultado de *p*NA liberada desde el sustrato Ac-AAP-*p*NA.

- 35 La Figura 1 demuestra que la Endopro inmovilizada en vehículos Purolite® ECR8310, -8319 y -8417 mostraron actividad. No se detectó actividad con la EndoPro inmovilizada en el vehículo Purolite® ECR8214. Por lo tanto, no se realizó un estudio adicional de este preparado particular.

Ejemplo 3. Eliminación de gliadina del mosto de cerveza usando EndoPro inmovilizada

- 40 Para probar si la EndoPro inmovilizada en vehículos Purolite® ECR8310, -8319 y -8417 era activa también en gluten, se añadieron 0,05 mg de enzima, EndoPro inmovilizada y libre (control), respectivamente, a 10 ml de mosto de cerveza (Research Brewery St. Johann, Train-St. Johann, Alemania; número de lote: 4/2013) en un tubo de reacción de 15 ml.

Las mezclas se agitaron toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, el contenido en gluten en el mosto de cerveza se determinó mediante el proceso como se describe en los métodos. Los resultados en la Figura 2 muestran el contenido de gliadina residual en el mosto de cerveza.

Se encontró que la EndoPro inmovilizada tenía la mejor actividad hacia el sustrato de proteína grande cuando se inmoviliza en vehículo Purolite® ECR8319 inmovilizado según el proceso como se describe en el Ejemplo 1. En comparación, cuando se inmoviliza en el mismo vehículo bajo condiciones diferentes (pH 8,2, molaridad 35 mM, carga enzimática 80 mg/g de vehículo) solo se obtuvo aproximadamente la mitad de la actividad hacia el gluten (no se muestran datos).

Ejemplo 4. Actividad relativa de EndoPro inmovilizada y libre a 4°C en comparación con 40°C

Para la determinación de la actividad relativa a 4°C en comparación con la actividad a 40°C la enzima EndoPro Purolite® ECR8319 no inmovilizada e inmovilizada (preparación de inmovilizada como se describe anteriormente) se añadió a NaOAc 0,1M, pH 5,0 que comprende Ac-AAP-pNA 3 mM en un volumen total de 1 ml. Las mezclas de reacción se agitaron a 900 rpm en un mezclador termo-regulado (Eppendorf). Se tomó una muestra de sobrenadante cada minuto y la reacción se paró con HCl 0,5M (relación muestra/HCl de 50/1 (v/v)). La absorbancia a 405 nm se midió usando el espectrofotómetro Tecan GENios. Las pendientes (DO 405 nm/min) a 4°C se compararon con las pendientes a la temperatura de actividad óptima de 40°C. La actividad absoluta de Endopro inmovilizada fue 0,53 y 1,85 DO 405 nm/min y de Endopro no inmovilizada 0,06 y 0,65 DO 405 nm/min a 4°C y 40°C, respectivamente. La actividad a 40°C se ajustó a 100%.

La Figura 3 muestra que la actividad relativa de EndoPro inmovilizada a 4°C es 3 veces mayor que la actividad relativa de la EndoPro no inmovilizada.

Ejemplo 5. Conversión de gliadina en cerveza mediante la EndoPro inmovilizada a 4 y 15°C

Tres volúmenes diferentes (Tabla 3) de la EndoPro inmovilizada inmovilizada en preparación de Purolite® ECR8319 como se describe en el Ejemplo 1, se pipetearon en 50 ml de cerveza (Research Brewery St. Johann, Train-St. Johann, Alemania; número de lote: 42/2012). Las mezclas se incubaron a 4°C y 15°C, respectivamente, en un mezclador de rodillo. Se tomaron muestras de 1 ml de cerveza después de 0,5, 1, 19 y 24 h. La gliadina residual en las muestras se determinó por el proceso como se describe en los métodos. Los resultados se representan en la Tabla 3 y muestran la reducción de gliadina en la cerveza. En general, la EndoPro inmovilizada es capaz de degradar la gliadina en cerveza a una temperatura de 4°C en el mismo grado o similar que a 15°C. Después de 24 horas, la gliadina se degradó en todas las muestras a un límite indetectable (LOD 2,5 ppm). Usando mayores dosis de EndoPro inmovilizada (10 ml), la gliadina podría degradarse a un límite indetectable incluso después de 1 hora de la incubación.

Tabla 3. Eliminación de gliadina dependiente de tiempo-, dosis- y temperatura de la cerveza mediante EndoPro inmovilizada. La concentración de gliadina residual se indica como sigue: (+++) >>2,5 ppm de gliadina, (++) >2,5 ppm, (+) ≤2,5 ppm, (-) sin gliadina.

	4°C				15°C			
Tiempo (h)	0,5	1	19	24	0,5	1	19	24
Enzima (ml)								
0,25	+++	+++	+	-	+++	+++	-	-
2,5	++	++	-	-	++	+	-	-
10	+	-	-	-	-	-	-	-

Conclusión

Los resultados mostrados en los Ejemplos 1 a 5 muestran que la endoproteasa específica para prolina inmovilizada según la presente invención puede convertir un sustrato complejo tal como gluten.

REIVINDICACIONES

1. Una endoproteasa específica de prolina inmovilizada, en donde la endoproteasa específica de prolina se inmoviliza reticulando a un vehículo de metacrilato funcionalizado con dimetileno.
- 5 2. La endoproteasa específica de prolina inmovilizada según la reivindicación 1, en donde el vehículo tiene un intervalo de tamaño de partícula de 100 a 400 μm .
3. La endoproteasa específica de prolina inmovilizada según la reivindicación 1 o 2, en donde el vehículo tiene una distribución de tamaño de poro d50 de 1500-2100 Å.
4. La endoproteasa específica de prolina inmovilizada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la endoproteasa específica de prolina es de *Aspergillus*, preferiblemente *Aspergillus niger*.
- 10 5. Un proceso para producir endoproteasa específica de prolina inmovilizada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende activar el grupo amino en un vehículo de metacrilato funcionalizado con dimetileno, con un agente de reticulado bifuncional, e inmovilizar la endoproteasa específica de prolina en el vehículo.
- 15 6. El proceso según la reivindicación 5, en donde la endoproteasa específica de prolina se inmoviliza en el vehículo a una relación enzima: vehículo de 0,01 – 0,07 p/p.
7. El proceso según la reivindicación 5 o 6, en donde el agente de reticulado bifuncional es glutaraldehído.
8. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde la inmovilización se realiza a una temperatura de entre 10 a 50°C.
- 20 9. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde la inmovilización se realiza a un pH de 6 a 8.
10. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en donde la inmovilización se realiza entre 4 a 48 horas.
11. Un proceso para producir cerveza que comprende las etapas de
 - a. preparar un macerado,
 - 25 b. fermentar la cerveza, y
 - c. estabilizar la cerveza,en donde la cerveza se incuba con la endoproteasa específica de prolina inmovilizada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 30 12. El proceso según la reivindicación 11, en donde la endoproteasa específica de prolina inmovilizada se incuba durante o después de la estabilización de la cerveza.
13. El proceso según la reivindicación 11 o 12, en donde dicha incubación se realiza a una temperatura de entre 0 y 20°C.
14. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde dicha incubación comprende la hidrólisis de gluten.
- 35 15. El uso de una endoproteasa específica de prolina inmovilizada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la hidrólisis de gluten en fragmentos no tóxicos.

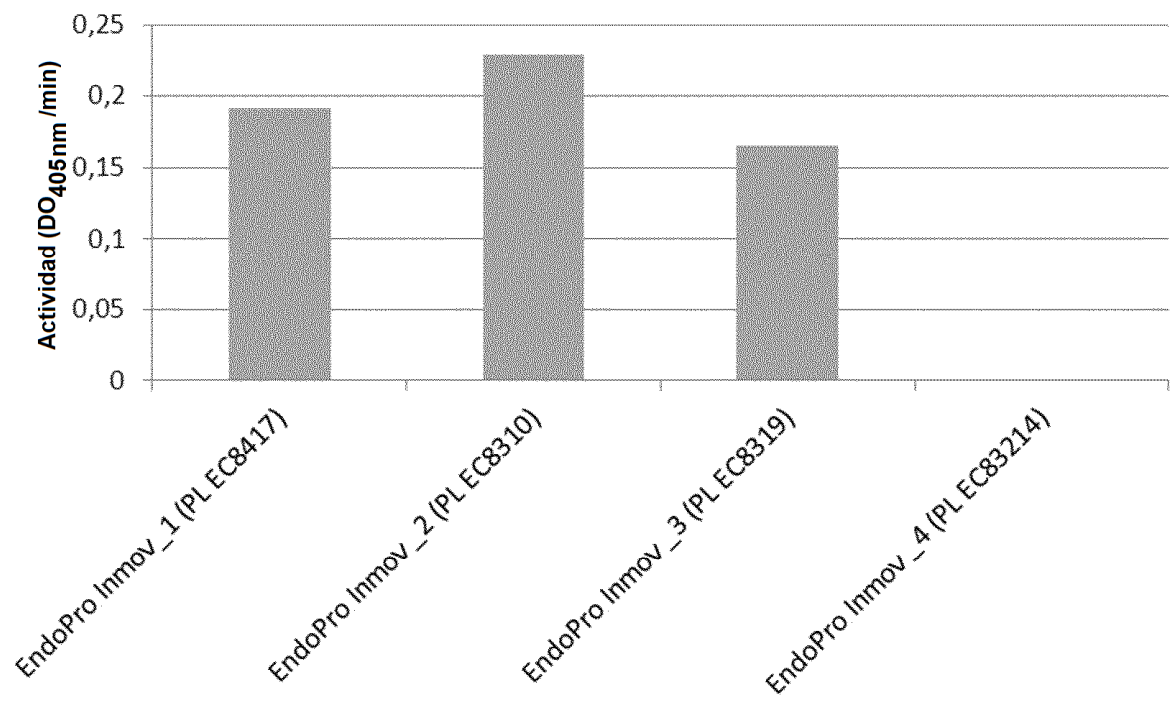


Fig. 1

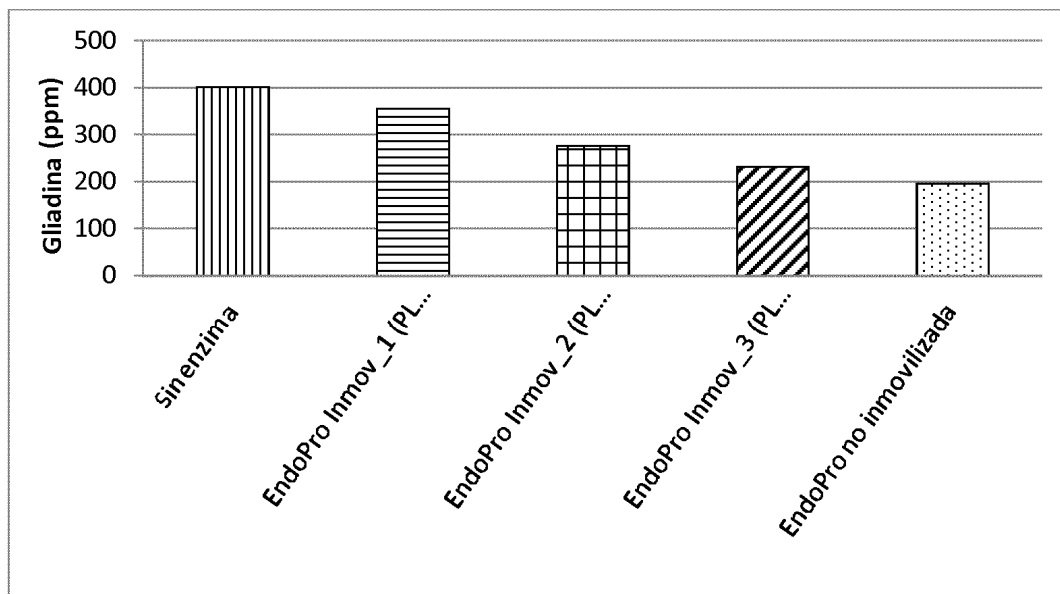


Fig. 2

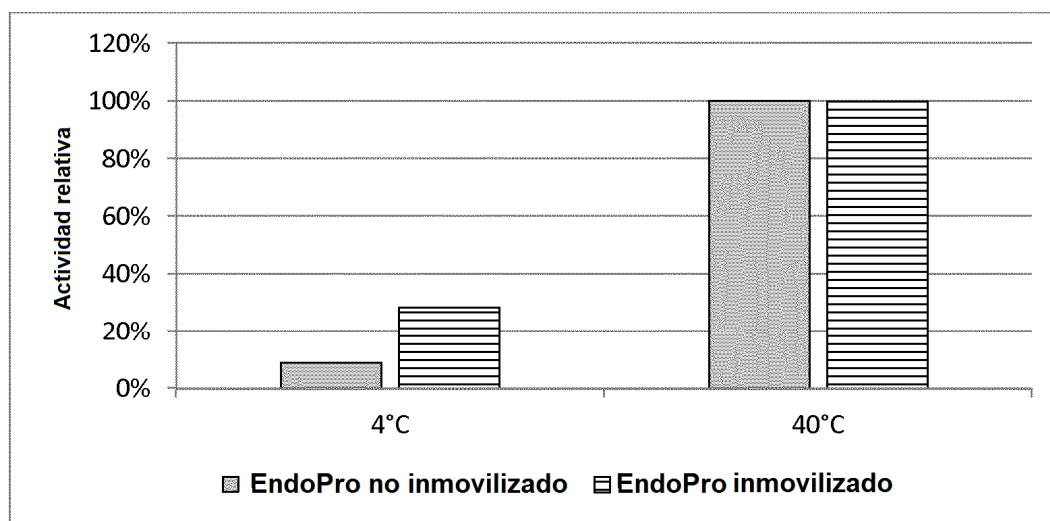


Fig. 3