

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 952**

51 Int. Cl.:

C12N 9/42	(2006.01) C12R 1/885	(2006.01)
C12N 9/24		(2006.01)
C12C 5/00		(2006.01)
C12C 7/04		(2006.01)
C12C 1/00		(2006.01)
C12G 3/12		(2006.01)
C12N 1/14		(2006.01)
C12P 7/06		(2006.01)
A23L 2/02		(2006.01)
C12R 1/80		(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2010 PCT/EP2010/056259**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.11.2010 WO10128140**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2010 E 10721415 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2427550**

54 Título: **Complejo enzimático de enzimas de Trichoderma Reesei y P. Funiculosum**

30 Prioridad:

07.05.2009 EP 09159680
07.05.2009 US 176162 P

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

07.06.2019

73 Titular/es:

DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)
Langebrogade 1
1411 Copenhagen K, DK

72 Inventor/es:

FISH, NEVILLE MARSHALL y
MILLER, LONE BRØND

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 715 952 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

Complejo enzimático de enzimas de *Trichoderma Reesei* y *P. Funiculosum*

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un complejo enzimático mejorado que tiene una pluralidad de actividades enzimáticas de un producto de expresión obtenido por fermentación del género *Trichoderma* en combinación con una o más enzimas de una especie diferente de una cepa de hongo.

Antecedentes de la invención

10 Es bien conocido el uso de enzimas en la producción de cerveza. En el documento WO 97/42302 se describe la aplicación de enzimas a la etapa de maceración para mejorar la capacidad de filtrado de la papilla y aumentar el rendimiento del extracto.

Los documentos WO20051 1 8769 y WO2005059084 se refieren a una etapa de maceración y filtración en un proceso para la producción de cerveza y a composiciones enzimáticas para usar en dicho proceso.

El documento WO1999057325 se refiere a cepas de *Penicillium funiculosum*, a nuevas mezclas enzimáticas obtenidas de este y a secuencias nucleicas de estas.

15 El documento WO2008023060 se refiere a un complejo enzimático mejorado que tiene una pluralidad de actividades enzimáticas de un producto de expresión obtenido por fermentación del género *Trichoderma* en combinación con una o más enzimas de una cepa de hongo diferente.

20 Sin embargo, existe la necesidad de complejos enzimáticos mejorados útiles en la producción de productos alimenticios, como en las etapas de maceración, cocción y filtración en la producción de una bebida alcohólica como la cerveza o el whisky.

Objeto de la invención

Es un objeto de las realizaciones de la invención proporcionar un complejo enzimático mejorado que permita métodos de producción mejorados en la preparación de, p. ej., productos alimenticios, como en las etapas de maceración, cocción y/o filtración en la producción de una bebida alcohólica, como cerveza o whisky o un biocombustible.

Resumen de la invención

El(los) presente(s) inventor(es) ha(n) encontrado que al combinar un producto de expresión obtenido por fermentación de una especie del género *Trichoderma* y enzimas específicas de una especie diferente de un hongo se obtienen propiedades mejoradas del complejo enzimático. Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un complejo enzimático que tiene actividad beta-1,4-endoglucan hidrolasa que comprende:

- 30 a. un producto de fermentación de *Trichoderma reesei*; y
- b. un producto de fermentación de *Penicillium funiculosum* que comprende una o más enzimas seleccionadas de una xilanas (EC 3.2.1.8), una celulasa (EC 3.2.1.4) y una beta-glucanasa (EC 3.2.1.6);

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para la producción de un complejo enzimático, el proceso que comprende las etapas de

- 35 a. fermentación de *Trichoderma reesei* en un medio para obtener un caldo de fermentación;
- b. fermentación de *Penicillium funiculosum* en un medio para obtener un caldo de fermentación, y
- c. recuperación y combinación de cada caldo de fermentación derivado de las etapa a) y b) en forma de un caldo libre de células para obtener un complejo enzimático, en donde la relación entre la actividad de la beta-1,4-endoglucan hidrolasa de *Penicillium funiculosum* y de *Trichoderma reesei* es de 0,25/0,75 a 0,35/0,65 en donde la actividad de la
- 40 beta-1,4-endoglucan hidrolasa del complejo enzimático se mide mediante el ensayo de la reivindicación 1.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un complejo enzimático de acuerdo con la invención, en un proceso de producción de una papilla cervecera, como en la producción de una bebida de malta, como una cerveza, como una bebida de cerveza de malta y/o en una producción de whisky y/o en la producción de biocombustible.

45 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un complejo enzimático de acuerdo con la invención en la producción de zumo de fruta, vino, procesamiento de grano, alcohol de combustible y alcohol potable.

Leyendas de la figura

Figura 1. Ensayo de la papilla a escala de laboratorio 1- β -glucano del mosto y volumen de filtración.

Figura 2. Ensayo de la papilla a escala de laboratorio 2- datos de volúmenes de filtración, β -Glucano residual y viscosidad (a 12°P) del mosto.

Figura 3. Datos de la clarificación del ensayo piloto- Tiempo total de clarificación, Caudal promedio y aumento de la presión total. A: Control negativo, Control sin enzima; B: LAMINEX® Super a 0,20 kg/t; C: El LAMINEX® XG (LAMINEX® Super 1,5 + 50% más de actividad de *T. reesei*) a 0,133 kg/t.

Descripción detallada de la invención

La cerveza se conoce tradicionalmente como una bebida alcohólica derivada de la malta, como la malta derivada de la cebada y complementos opcionales como los granos de cereales y aromatizada con lúpulo. Dentro del término "cerveza" se incluye cualquier mosto fermentado producido por la elaboración y la fermentación de un material que contiene almidón, principalmente derivado de granos de cereales como la cebada malteada. También se puede usar trigo, maíz y arroz.

Como se usa en esta memoria, el término "bebida de malta" incluye tales bebidas de malta fermentadas que forman espuma como cerveza malteada completa, "ale", cerveza seca, cerveza "near" (bebida de malta con poco o sin contenido en alcohol), cerveza "light", cerveza baja en alcohol, cerveza baja en calorías, porter, cerveza "bock", stout "cerveza negra", licor de malta, licor de malta no alcohólico y similares. El término "bebidas de malta" también incluye cerveza no espumosa y bebidas de malta alternativas como bebidas de malta con sabor a frutas, p. ej., con sabor a cítricos, como bebidas de malta con sabor a limón, naranja, lima o bayas, bebidas de malta con sabor a licor, p. ej., licor de malta con sabor a vodka, ron o tequila o bebidas de malta con sabor a café, como licor de malta con sabor a cafeína y similares.

La cerveza se puede fabricar a partir de una gran variedad de granos esencialmente por el mismo proceso. Todos los almidones de grano son homopolímeros de glucosa en los que los residuos de glucosa están unidos por enlaces alfa-1,4- o alfa-1,6-, predominando el primero.

El proceso de fabricar bebidas de malta fermentadas se conoce comúnmente como elaboración de cerveza. Las principales materias primas usadas en la fabricación de estas bebidas son agua, lúpulo y malta. Además, se pueden usar como una fuente de almidón complementos como sémolas de maíz común, sémolas de maíz refinado, levadura molida de cerveza, arroz, sorgo, almidón de maíz refinado, cebada, almidón de cebada, cebada descascarillada, trigo, almidón de trigo, cereal torrefacto, copos de cereal, centeno, avena, patata, tapioca y jarabes como jarabe de maíz, jarabe de caña de azúcar, jarabe de azúcar invertido, jarabes de cebada y/o trigo y similares. El almidón se convertirá finalmente en dextrinas y azúcares fermentables.

Por varias razones, la malta, que se produce principalmente a partir de variedades seleccionadas de cebada, tiene el mayor efecto sobre el carácter y la calidad general de la cerveza. Primero, la malta es el agente saborizante principal en la cerveza. En segundo lugar, la malta proporciona la mayor parte del azúcar fermentable. En tercer lugar, la malta proporciona las proteínas que contribuirán al cuerpo y al carácter espumoso de la cerveza. Cuarto, la malta proporciona la actividad enzimática necesaria durante la maceración.

Los lúpulos también contribuyen significativamente a la calidad de la cerveza, incluyendo el sabor. En particular, los lúpulos (o sus componentes) agregan sustancias amargas deseables a la cerveza. Además, los lúpulos actúan como precipitantes de proteínas, se constituyen como agentes conservantes y ayudan en la formación y estabilización de la espuma.

El proceso para fabricar cerveza es bien conocido en la técnica, pero brevemente, implica cinco etapas: (a) maceración y/o cocción complementaria (b) separación y extracción del mosto (c) cocción y adición de lúpulo al mosto (d) enfriamiento, fermentación y almacenaje y (e) maduración, procesamiento y empaquetado.

Normalmente, en la primera etapa, la malta molida o triturada se mezcla con agua y se mantiene durante un periodo de tiempo bajo temperaturas controladas para permitir que las enzimas presentes en la malta conviertan el almidón presente en la malta en azúcares fermentables.

En la segunda etapa, la papilla se transfiere a una "cuba filtro" o filtro de papilla donde se separa el líquido del residuo de grano. Este líquido dulce se llama "mosto" y el residuo de grano sobrante se llama "afrecho". La papilla se somete típicamente a una extracción que implica agregar agua a la papilla con el fin de recuperar el extracto soluble residual del afrecho.

En la tercera etapa, el mosto se hierva vigorosamente. Esto esteriliza el mosto y ayuda a desarrollar el color, sabor y olor. Los lúpulos se añaden en algún momento durante la ebullición.

En la cuarta etapa, el mosto se enfría y se transfiere a un fermentador, que contiene la levadura o al que se le agrega la levadura. La levadura convierte los azúcares por fermentación en alcohol y gas dióxido de carbono; al final de la

fermentación el fermentador se enfría o el fermentador se puede enfriar para detener la fermentación. La levadura flocula y se elimina.

5 En la última etapa, la cerveza se enfría y se almacena durante un periodo de tiempo durante el cual se aclara la cerveza y se desarrolla su sabor y se asienta cualquier material que pueda dañar el aspecto, el sabor y la vida útil de la cerveza. Antes del envasado, la cerveza se carbonata y, opcionalmente, se filtra y se pasteuriza.

Después de la fermentación, se obtiene una bebida que generalmente contiene de aproximadamente 2% a aproximadamente 10% de alcohol en peso. Los carbohidratos no fermentables no se convierten durante la fermentación y forman la mayoría de los sólidos disueltos en la cerveza final.

10 Este residuo permanece debido a la incapacidad de las amilasas de la malta para hidrolizar los enlaces alfa-1,6 del almidón. Los carbohidratos no fermentables contribuyen con aproximadamente 50 calorías por cada (12 onzas) 340,19 gramos de cerveza.

15 Recientemente, ha habido una popularización generalizada de bebidas elaboradas llamadas cervezas ligeras, cervezas con calorías reducidas o cervezas bajas en calorías, particularmente en el mercado de los Estados Unidos. Como se define en los EE.UU, estas cervezas tienen aproximadamente un 30% menos de calorías que una cerveza "normal" de fabricante.

20 Se puede encontrar más información sobre los procesos de elaboración de cerveza convencionales, así como las definiciones de los términos usados en el campo de la tecnología de la elaboración de la cerveza que se aplicará en la presente invención en "Technology Brewing and Malting" por Wolfgang Kunze del Instituto de Investigación y Enseñanza de la Elaboración de la Cerveza, Berlín (VLB), 2ª Edición revisada 1999, ISBN 3-921690-39-0 o 3ª edición (2004): ISBN 3-921690-49-8.

Definiciones

25 El término "complejo enzimático" como se usa en esta memoria significa en el presente contexto una composición sustancialmente libre de células que comprende varias enzimas que tienen una actividad enzimática diferente y/o están clasificadas bajo diferentes números de la Comisión de Enzimas (número EC). Cuando el "complejo enzimático" se obtiene por fermentación, es el caldo de fermentación sustancialmente libre de células, opcionalmente el caldo de fermentación concentrado, el que se incluye en el producto final. Se debe entender que el término "complejo enzimático" también abarca una composición que comprende varias enzimas derivadas de dos o más procesos de fermentación separados que también pueden implicar diferentes microorganismos. En algunas realizaciones, el complejo enzimático es un complejo enzimático de calidad alimentaria, lo que significa que se puede usar para la preparación de productos alimenticios.

35 En algunos aspectos de la invención, el complejo enzimático de acuerdo con la invención contiene las actividades secundarias necesarias para degradar los compuestos muy complejos de p. ej., una papilla en un proceso de elaboración de la cerveza. El término "actividad secundaria" se refiere en el presente contexto a las actividades de una enzima hacia otros sustratos que no son su sustrato principal o se refiere a otras actividades que un complejo enzimático puede tener además de su actividad principal.

En un aspecto de la invención, el complejo enzimático de acuerdo con la invención comprende al menos 5 actividades secundarias diferentes.

En un aspecto de la invención, el complejo enzimático de acuerdo con la invención comprende al menos 10 actividades secundarias diferentes.

40 En un aspecto de la invención, el complejo enzimático de acuerdo con la invención comprende al menos 15 actividades secundarias diferentes.

En un aspecto de la invención, el complejo enzimático de acuerdo con la invención comprende al menos 20 actividades secundarias diferentes.

45 Las xilanasas se clasifican en EC 3.2.1.8, EC 3.2.1.32, EC 3.2.1.136 y EC 3.2.1.156; la actividad se puede medir p. ej., como se describe en el "Ensayo 2".

La endo-1,4-beta xilanasas se clasifica como EC 3.2.1.8. La enzima produce endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-xilosídicos en los xilanos.

50 El término "xilanasas de la familia 11" como se usa en esta memoria se refiere a una endo-1,4-beta xilanasas clasificada como EC 3.2.1.8, que produce endohidrólisis de los enlaces 1,4-beta-D-xilosídicos en los xilanos y que se clasifica como xilanasas de la familia 11 de acuerdo con B. Henrissat, A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 280 (1991), págs. 309-316.

En un aspecto, el complejo enzimático de acuerdo con la invención tiene actividad endo-1,4-beta xilanasas según se mide mediante el "Ensayo 2" como se describe a continuación bajo el encabezado "Ensayos".

El "ensayo 2" se puede llevar a cabo a pH 3,5 o pH 5 y 50°C usando xilano como sustrato, o se puede realizar a diferentes valores de pH y temperatura para la caracterización y especificación adicional de las enzimas. La actividad de la enzima se calcula a partir del aumento de la absorbancia producido por la xilosa a 540 nm por unidad de tiempo.

5 Una unidad de actividad xilanasa se define en esta memoria como la cantidad de enzima (normalizada para el volumen total del ensayo) que da un aumento de $\Delta OD_{540 \text{ nm}} \cdot \text{min}^{-1}$ en las condiciones del "Ensayo 2" (pH 3,5 y 50°C).

En algunas realizaciones, el complejo enzimático de acuerdo con la invención comprende una actividad xilanasa de al menos aproximadamente 5000 U/g, como al menos aproximadamente 6000 U/g, como al menos aproximadamente 7000 U/g, como al menos aproximadamente 8000 U/g, como al menos aproximadamente 8500 U/g, según lo medido mediante el "Ensayo 2".

10 El complejo enzimático de acuerdo con la invención tiene una actividad celulolítica. El nombre sistemático de la celulosa es 4-(1,3;1,4)- β -glucan 4-glucanohidrolasa y las enzimas celulolíticas o celulasas se clasifican como EC 3.2.1.4. La celulasa endohidroliza enlaces (1 \rightarrow 4)- β -D-glucosídicos en p. ej., celulosa, liquenina y β -D-glucanos de cereales y también hidrolizará enlaces 1,4 en β -D-glucanos que también contienen enlaces 1,3. La celulasa tiene también otros nombres como endo-1,4- β -D-glucanasa, β -1,4-glucanasa, β -1,4-endoglucan hidrolasa, celulasa A, celulosina AP, endoglucanasa D, celulosa alcalina, celulasa A 3, celudextrinasa, celulasa 9.5, avicelasa, pancelasa
15 SS y 1,4-(1,3;1,4)- β -D-glucan 4 glucanohidrolasa.

En un aspecto de la invención, la actividad celulasa del complejo enzimático de acuerdo con la invención se mide mediante el "Ensayo 1" como se describe a continuación bajo el encabezado "Ensayos".

20 En aspectos adicionales, el complejo enzimático de acuerdo con la invención tiene actividad β -glucanasa y se determina como se describe en el "Ensayo 7".

El ensayo estándar se lleva a cabo a pH 5,0 y se puede realizar a diferentes valores de pH para la caracterización y especificación adicional de las enzimas.

Una unidad de actividad endo-1,3(4)- β -glucanasa se define como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de equivalentes de glucosa por minuto en las condiciones del ensayo (pH 5,0 (o como se especifica) y 50°C).

25 En algunas realizaciones el complejo enzimático de acuerdo con la invención comprende una actividad β -glucanasa de al menos 10000 U/g, como al menos aproximadamente 12000 U/g, como al menos aproximadamente 14000 U/g, como al menos aproximadamente 15000 U/g, como al menos aproximadamente 18000 U/g, medida por el "Ensayo 7".

30 La " β -glucanasa" o "beta-glucanasa" como se usa en esta memoria se refiere a una endo-1,3(4)-beta-glucanasa de EC 3.2.1.6. Cataliza la endohidrólisis de enlaces (1 \rightarrow 3) o (1 \rightarrow 4) en los beta-D-glucanos cuando el residuo de glucosa cuyo grupo reductor está implicado en el enlace a hidrolizar está sustituido en C-3.

En aspectos adicionales, el complejo enzimático de acuerdo con la invención tiene actividad laminarinasa se determina como se describe en el "Ensayo 3".

35 La laminarinasa puede ser endo-1,3(4)-beta-glucanasa clasificada como EC 3.2.1.6 o Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidasa clasificada como E.C. 3.2.1.39. La endo-1,3(4)-beta-glucanasa con los nombres alternativos, Laminarinasa, Endo-1,3-beta-glucanasa, Endo-1,4-beta-glucanasa se clasifica como EC 3.2.1.6. Los sustratos incluyen laminarina, liquenina y D-glucanos de cereal y la enzima cataliza la endohidrólisis de enlaces (1 \rightarrow 3) o (1 \rightarrow 4) en los beta-D-glucanos cuando el residuo de glucosa cuyo grupo reductor está implicado en el enlace a hidrolizar está sustituido en C-3. La glucan endo-1,3-beta-D-glucosidasa con los nombres alternativos (1 \rightarrow 3)-beta-glucan endohidrolasa, Endo-1,3-beta-glucanasa y Laminarinasa se clasifica como EC 3.2.1.39 e hidroliza enlaces (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucosídicos en (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucanos en sustratos como por ejemplo laminarina, paramilón y pachyman.
40

45 En algunos aspectos, el complejo enzimático de acuerdo con la invención tiene actividad arabinanasa. La arabinanasa está clasificada como EC 3.2.1.99. El nombre sistemático es 5- α -L-arabinan 5- α -L-arabinanohidrolasa, pero tiene otros nombres como arabinan endo-1,5- α -L-arabinosidasa y endo-1,5- α -L-arabinanasa, endo- α -1,5-arabanasa, endo-arabanasa, 1,5- α -L-arabinan y 1,5- α -L-arabinanohidrolasa. La arabinasa hidroliza enlaces (1 \rightarrow 5)- α -arabinofuranosídicos en (1 \rightarrow 5)-arabinanos. La arabinanasa también actúa sobre el arabinano.

50 En un aspecto de la invención, la actividad arabinasa del complejo enzimático de acuerdo con la invención se mide mediante el "Ensayo 4" como se describe a continuación bajo el encabezado "Ensayos". El ensayo se puede llevar a cabo a pH 3,5 y 50°C usando arabinano de remolacha azucarera como sustrato y se puede realizar a diferentes valores de pH y temperatura para la caracterización y especificación adicional de enzimas. La actividad enzimática se calcula a partir del aumento de absorbancia a 540 nm por unidad de tiempo.

Una unidad de actividad arabinasa se define como la cantidad de enzima (normalizada para el volumen total del ensayo) que produce un aumento de $\Delta OD_{540 \text{ nm}} \cdot \text{min}^{-1}$ en las condiciones del ensayo (pH 3,5 y 50°C).

En algunos aspectos, el complejo enzimático de acuerdo con la invención tiene actividad beta-D-glucósido glucohidrolasa. La beta-D-glucósido glucohidrolasa se refiere a las enzimas de EC 3.2.1.21.

5 En algunos aspectos, el complejo enzimático de acuerdo con la invención tiene actividad β -Xilosidasa. La " β -Xilosidasa" o "Xilan 1,4-beta-xilosidasa" se refiere a enzimas de EC 3.2.1.37. La β -Xilosidasa cataliza la hidrólisis de (1 \rightarrow 4)-beta-D-xilanos para eliminar los residuos de D-xilosa sucesivos de los extremos no reductores.

En un aspecto de la invención, la actividad celobiohidrolasa del complejo enzimático de acuerdo con la invención se mide mediante el "Ensayo 6" como se describe a continuación bajo el encabezado "Ensayos". El ensayo estándar se lleva a cabo a pH 5,0 y se puede realizar a diferentes valores de pH para la caracterización y especificación adicional de enzimas.

10 Una unidad de actividad celobiohidrolasa se define como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de p-nitrofenol a partir de p-nitrofenil β -D-celobiopiranosido por minuto bajo las condiciones del ensayo (pH 5,0 (o según lo especificado) y 50°C).

15 En algunos aspectos, el complejo enzimático de acuerdo con la invención tiene actividad celobiohidrolasa. La "celobiohidrolasa" o "Celulosa 1,4-beta-celobiosidasa" se refiere a enzimas de EC 3.2.1.91. La celulosa 1,4-beta-celobiosidasa cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en celulosa y celotetraosa, liberando celobiosa de los extremos no reductores de las cadenas.

20 En un aspecto de la invención, la actividad arabinofuranosidasa del complejo enzimático de acuerdo con la invención se mide mediante el "Ensayo 5" como se describe a continuación bajo el encabezado "Ensayos". El ensayo estándar se puede llevar a cabo a pH 5,0 y 50°C y se puede realizar a diferentes valores de pH y temperatura para la caracterización y especificación adicional de enzimas.

Una unidad de actividad α -N-arabinofuranosidasa se define como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de p-nitrofenol a partir de p-nitrofenil α -L-arabinofuranósido por minuto en las condiciones del ensayo (pH 5,0 y 50°C (o según lo especificado)).

25 En algunos aspectos, el complejo enzimático de acuerdo con la invención tiene actividad α -N-Arabinofuranosidasa. La " α -N-Arabinofuranosidasa" o "Alfa-N-arabinofuranosidasa" se refiere a enzimas de EC 3.2.1.55. La α -N-Arabinofuranosidasa cataliza la hidrólisis de residuos terminales no reductores alfa-L-arabinofuranósidos en alfa-L-arabinósidos.

30 En algunos aspectos, el complejo enzimático de acuerdo con la invención tiene actividad de glucan 1,4-beta-glucosidasa. La "Glucan 1,4-beta-glucosidasa" o "glucan 1,4-beta-glucosidasa" se refiere a enzimas de EC 3.2.1.74. La Glucan 1,4-beta-glucosidasa cataliza la hidrólisis de enlaces (1 \rightarrow 4) en (1 \rightarrow 4)-beta-D-glucanos para eliminar las unidades de glucosa sucesivas.

35 En algunos aspectos, el complejo enzimático de acuerdo con la invención tiene actividad exo-beta-1,4-glucanasa específica de xiloglucano. La "exo-beta-1,4-glucanasa específica de xiloglucano" se refiere a enzimas de EC 3.2.1.155. La exo-beta-1,4-glucanasa específica de xiloglucano cataliza la exohidrólisis de enlaces (1 \rightarrow 4)-beta-D-glucosídicos en el xiloglucano.

El complejo enzimático de acuerdo con el aspecto que sigue se puede usar en un proceso que comprende reducir la viscosidad de una solución acuosa que comprende un hidrolizado de almidón.

40 El complejo enzimático también se puede usar en un proceso que comprende filtrar una solución acuosa que comprende un hidrolizado de almidón. En algunas realizaciones, la solución acuosa que comprende un hidrolizado de almidón es una papilla para la fabricación de cerveza, y en otras realizaciones, la solución acuosa que comprende un hidrolizado de almidón es una composición alimenticia.

Alternativamente, el complejo enzimático de acuerdo con la presente invención se puede usar en la producción de jugo de fruta, vino, procesamiento de grano, alcohol combustible, como el bioetanol y alcohol potable.

45 En algunas realizaciones el bioetanol se produce a partir de materias primas agrícolas como caña de azúcar, patata, maíz, sorgo de trigo, etc. o a partir de material celulósico como rastrojo de maíz, hierba de césped u otro material vegetal. En ambos casos, los azúcares fermentables se extraen de la materia prima y son fermentados por los microorganismos a alcohol, que se destila y se puede usar como combustible de transporte. El complejo enzimático de acuerdo con la presente invención se puede usar en esta producción de biocombustible. Se puede añadir el complejo de enzimas para mejorar la extracción de polisacáridos de la materia prima, ayudar a degradar los
50 polisacáridos en azúcares fermentables y/o mejorar los parámetros de procesamiento como la separación de líquidos de sólidos, características de flujo y capacidad de bombeo.

El proceso de la invención se puede aplicar en la maceración de cualquier molienda. De acuerdo con la invención, la molienda puede comprender cualquier material vegetal que contenga almidón y/o azúcar derivado de cualquier planta y parte de la planta, que incluye tubérculos, raíces, tallos, hojas y semillas.

En algunas realizaciones la molienda comprende granos como granos de cebada, trigo, centeno, avena, maíz, arroz, milo, mijo y sorgo, y más preferiblemente, al menos el 10%, o más preferiblemente al menos el 15%, incluso más preferiblemente al menos el 25%, o lo más preferiblemente al menos el 35%, como al menos el 50%, al menos el 75%, al menos el 90% o incluso el 100% (p/p) de la molienda del mosto se deriva del grano.

- 5 En algunas realizaciones la molienda comprende grano malteado, como malta de cebada. Preferiblemente, al menos el 10%, o más preferiblemente al menos el 15%, incluso más preferiblemente al menos el 25%, o más preferiblemente al menos el 35%, como al menos el 50%, al menos el 75%, al menos el 90% o incluso el 100% (p/p) de la molienda del mosto se deriva del grano malteado.

- 10 El término “fermentación” significa en el presente contexto la producción de sustancias como enzimas creciendo microorganismos en un cultivo.

Como se usa en esta memoria el término “malta” se entiende como cualquier grano de cereal malteado, como la cebada.

El término “complemento” se entiende como la parte de la molienda que no es malta de cebada. El complemento puede ser cualquier material rico en carbohidratos.

- 15 El término “papilla” se entiende como una suspensión espesa acuosa de almidón, p. ej., que comprende malta de cebada triturada, cebada triturada y/u otro complemento o una combinación de esta memoria, mezclada con agua para después ser separada en mosto + afrecho.

El término “separación de la papilla” se entiende como la separación del mosto del afrecho, como clarificación o filtración de la papilla.

- 20 El término “filtración de cerveza” se entiende como un proceso de separación en el que se eliminan las células de levadura y otros materiales que producen turbidez aún presentes en la cerveza, como por microfiltración o procesos con membrana.

- 25 La preparación del complejo enzimático, como en forma de un ingrediente alimentario preparado de acuerdo con la presente invención, puede estar en forma de una solución o como un sólido, dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración. La forma sólida puede ser ya sea como enzima seca en polvo o como enzima granulada.

En un aspecto la invención proporciona una preparación de complejo enzimático que comprende el complejo enzimático de acuerdo con la invención, un transportador de la enzima y opcionalmente un estabilizante y/o un conservante.

- 30 En otro aspecto más de la invención, el transportador de la enzima se selecciona del grupo que consiste en glicerol o agua.

- 35 En un aspecto adicional, la preparación comprende un estabilizante. En un aspecto, el estabilizante se selecciona del grupo que consiste en sales inorgánicas, polioles, azúcares y combinaciones de estos. En un aspecto, el estabilizante es una sal inorgánica como cloruro potásico. En otro aspecto, el poliol es glicerol, propilenglicol o sorbitol. En otro aspecto más, el azúcar es un carbohidrato de molécula pequeña, en particular cualquiera de varios de sabor dulce como la glucosa, fructosa y sacarosa.

En otro aspecto adicional, la preparación comprende un conservante. En un aspecto, el conservante es metil parabeno, propil parabeno, benzoato, sorbato u otros conservantes aprobados para alimentos o una mezcla de estos.

Realizaciones específicas de la invención

- 40 En esta memoria se describe un complejo enzimático derivado de una combinación de:

a. Un producto de expresión obtenido por fermentación de una especie del género *Trichoderma*; y

b. Una o más enzimas de una especie diferente del reino de los hongos seleccionadas de una xilanas (EC 3.2.1.8), una celulasa (EC 3.2.1.4) y una beta-glucanasa (EC 3.2.1.6);

- 45 y en donde al menos aproximadamente el 65% de la actividad beta-1,4-endoglucan hidrolasa según lo medido mediante el método del “Ensayo 1” como se describe en esta memoria se deriva de la fermentación del género *Trichoderma*.

En algunas realizaciones al menos aproximadamente el 66%, como al menos aproximadamente el 68%, como al menos aproximadamente el 69% de la actividad beta-1,4-endoglucan hidrolasa según lo medido mediante el método del “Ensayo 1” como se describe en esta memoria se deriva de la fermentación del género *Trichoderma*.

En algunas realizaciones no más de aproximadamente el 75%, como no más de aproximadamente el 70%, como no más de aproximadamente el 65% de la actividad beta-1,4-endoglucan hidrolasa según lo medido mediante el método del "Ensayo 1" como se describe en esta memoria se deriva de la fermentación del género *Trichoderma*.

5 La una o más enzimas de un hongo diferente en el complejo enzimático de acuerdo con la invención es un producto de expresión obtenido por fermentación de estos hongos diferentes.

Los hongos diferentes son del género *Penicillium*.

10 En algunas realizaciones, el producto de expresión obtenido mediante fermentación de los diferentes hongos comprende una xilanasa, como una xilanasa diferente de una xilanasa derivada del género *Trichoderma*. En algunas realizaciones, el producto de expresión obtenido mediante fermentación de los diferentes hongos comprende una xilanasa de la familia 11, como una xilanasa de la familia 11 diferente de una xilanasa de la familia 11 derivada del género *Trichoderma*.

15 En algunas realizaciones, el complejo enzimático de acuerdo con la invención comprende una o más actividades enzimáticas seleccionadas de la lista que consiste en endo-1,4-β-xilanasa, endo-1,3(4)-β-glucanasa, celulasa, laminarinasa, endo-1,5-α-L-arabinanasa, beta-D-glucósido glucohidrolasa, β-Xilosidasa, celobiohidrolasa, glucan 1,4-beta-glucosidasa, exo- beta-1,4-glucanasa específica de xiloglucano y α-N-Arabinofuranosidasa.

En algunas realizaciones el producto de expresión obtenido por fermentación de una especie del género *Trichoderma* es de un cultivo único de la especie *Trichoderma reesei*.

En algunas realizaciones el producto de expresión obtenido por fermentación de una especie del género *Penicillium* es de un cultivo único de la especie *Penicillium funiculosum*.

20 En algunas realizaciones el cultivo único usado para la fermentación no se ha modificado genéticamente.

El producto de expresión obtenido mediante la fermentación de una especie del género *Trichoderma* se obtiene por fermentación sumergida.

En algunas realizaciones el producto de expresión obtenido por fermentación del género *Trichoderma* es de las especie *Trichoderma reesei*.

25 En algunas realizaciones el producto de expresión obtenido por fermentación de un hongo diferente es del cultivo único de la especie *Penicillium funiculosum*.

En algunas realizaciones el producto de expresión obtenido por fermentación es de una especie de tipo salvaje.

30 En algunas realizaciones la cepa usada para preparar el complejo enzimático de la invención es *Trichoderma reesei* depositada bajo el tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC®) IP, Licencias y Servicios, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, EE.UU. que tiene una designación de cepa GC Celulosa A83 GICC 0004, M03000004 y una designación de depósito de patentes ATCC® de PTA-1001, en nombre de Danisco A/S en la fecha del 5 de mayo de 2009, o un derivado o progenie del mismo. (El depósito se probó en el International Depository Authority: American Type Culture Collection (ATCC®), Manassas, VA, EE.UU. el 14 de mayo de 2009 y en esa fecha las semillas/cepa(s) eran viables).

35 En algunas realizaciones la cepa usada en la preparación del complejo enzimático de la invención es *Penicillium funiculosum* depositado bajo el tratado de Budapest en el Instituto Internacional de Micología bajo el número IMI 378536, o un derivado o progenie de esta.

40 En algunas realizaciones el complejo enzimático de acuerdo con la invención tiene una actividad enzimática de al menos aproximadamente 3000 U/g, como al menos aproximadamente 4000 U/g, como al menos aproximadamente 5000 U/g, como al menos aproximadamente 6000 U/g, como al menos aproximadamente 7000 U/g, según lo medido mediante el "Ensayo 1" como se describe en esta memoria derivada de la fermentación del género *Trichoderma*.

45 En algunas realizaciones el complejo enzimático de acuerdo con la invención tiene una actividad enzimática total de al menos aproximadamente 4000 U/g, como al menos aproximadamente 5000 U/g, como al menos aproximadamente 6000 U/g, como al menos aproximadamente 7000 U/g, como al menos aproximadamente 8000 U/g, como al menos aproximadamente 9000 U/g, como al menos aproximadamente 10000 U/g, como al menos aproximadamente 11000 U/g, como al menos aproximadamente 12000 U/g, según lo medido mediante el "Ensayo 1" como se describe en esta memoria.

50 En algunas realizaciones el complejo enzimático de acuerdo con la invención consiste en aproximadamente 3100 u/g de *Penicillium funiculosum* y aproximadamente 5200 u/g de *Trichoderma reesei* en donde dichas unidades/g se determinan mediante el "Ensayo 1" como se describe en esta memoria.

En algunas realizaciones el complejo enzimático de acuerdo con la invención consiste en aproximadamente 2362 u/g de *Penicillium funiculosum* y aproximadamente 5315 u/g de *Trichoderma reesei* en donde dichas unidades/g se

determinan mediante el "Ensayo 1" como se describe en esta memoria. En algunas realizaciones el complejo enzimático de acuerdo con la invención tiene las especificaciones del producto "LAMINEX® XG" como se define en esta memoria.

5 En otro aspecto adicional, la cepa de *Trichoderma reesei* usada de acuerdo con la invención tiene características sustancialmente idénticas a las de la cepa de *Trichoderma reesei* depositada bajo el tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC) que tiene una designación de cepa GC Celulosa A83 GICC 0004, M03000004 depositada por Danisco A/S en la fecha del 5 de mayo de 2009.

10 En un aspecto adicional, la cepa es una cepa de *Trichoderma reesei* depositada bajo el tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC) que tiene una designación de cepa GC Celulosa A83 GICC 0004, M03000004 depositada por Danisco A/S en la fecha del 5 de mayo de 2009.

15 En el contexto de la presente invención, la expresión "características sustancialmente idénticas" significa que la cepa tiene una o más (preferiblemente todas) de las características de *Trichoderma reesei* depositada bajo el tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC), Depósito de Patentes, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110, que tiene una designación de cepa GC Celulosa A83 GICC 0004, M03000004 depositada por Danisco A/S en la fecha del 5 de mayo de 2009.

Como se describió anteriormente, la presente invención se refiere al uso de un complejo enzimático de acuerdo con la invención, en un proceso para la producción de una papilla cervecera, como en la producción de una bebida de cerveza de malta y/o en una producción de whisky. Las siguientes realizaciones son particularmente relevantes en el proceso de producción de la papilla cervecera.

20 Descrito en esta memoria, el complejo enzimático de la presente invención no se deriva de una combinación de un producto de expresión obtenido por fermentación de la especie *Trichoderma reesei* y un producto de expresión obtenido por fermentación de la especie de *Penicillium funiculosum*, en donde la relación entre la actividad beta-1,4-endoglucan hidrolasa derivada de *Penicillium funiculosum* y la de *Trichoderma reesei* es de aproximadamente 0,25/0,75 a 0,37/0,63, como desde aproximadamente 0,26/0,74 a 0,36/0,64, como desde aproximadamente 0,27/0,73 a 0,35/0,65, como desde aproximadamente 0,28/0,72 a 0,34/0,66, como desde aproximadamente 0,29/0,71 a 0,33/0,67, como desde aproximadamente 0,30/0,70 a 0,32/0,68, como desde aproximadamente 0,31/0,69.

30 El complejo enzimático de acuerdo con la presente invención se deriva de una combinación de un producto de expresión obtenido por fermentación de la especie *Trichoderma reesei* y un producto de expresión obtenido por fermentación de la especie de *Penicillium funiculosum*, en donde la relación entre la actividad beta-1,4-endoglucan hidrolasa derivada de *Penicillium funiculosum* y la de *Trichoderma reesei* es de aproximadamente 0,25/0,75 a 0,35/0,65, como desde aproximadamente 0,27/0,73 a 0,35/0,65, como desde aproximadamente 0,28/0,72 a 0,34/0,66, como desde aproximadamente 0,29/0,71 a 0,33/0,67, como desde aproximadamente 0,30/0,70 a 0,32/0,68, como desde aproximadamente 0,31/0,69.

35 En algunas realizaciones el complejo enzimático se usa en la papilla para ayudar a la clarificación y/o filtración de la papilla y/o la filtración de la cerveza.

En algunas realizaciones el complejo enzimático se usa en la papilla para ayudar a la separación de la papilla.

En algunas realizaciones hay una reducción en el β -glucano residual del mosto, como una reducción de al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30% en comparación con el control sin enzima, o al menos el 2%, 5% o el 10% en comparación con un control que usa LAMINEX® Super.

40 En algunas realizaciones hay una viscosidad reducida, como la viscosidad del mosto, como una reducción de al menos el 2,5%, al menos el 5% o al menos el 7,5% en comparación con un control sin enzima.

45 En algunas realizaciones hay un aumento en los ciclos de cocción/día, como un aumento de al menos el 5%, como al menos el 10% o al menos el 20% en comparación con un control sin enzima, o al menos el 2,5%, al menos el 5% o al menos el 10% en comparación con un control que usa LAMINEX® Super con la misma actividad enzimática o comparable al del componente *Penicillium funiculosum*.

En algunas realizaciones hay una capacidad de filtrado aumentada.

En algunas realizaciones hay una separación de la papilla aumentada.

50 En algunas realizaciones hay un caudal aumentado durante la separación de la papilla, como un aumento de al menos el 10%, al menos el 15% o al menos el 20% en comparación con un control sin enzima, o al menos el 2,5%, al menos el 5% o al menos el 10% en comparación con un control que usa LAMINEX® Super.

Se debe entender que dicho caudal se define como el caudal medio calculado a partir del tiempo total de separación.

En algunas realizaciones hay una disminución en el tiempo de purga o de extracción, como una disminución de al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15% o al menos el 20% en comparación con un control sin enzima, o con un control que usa LAMINEX® Super.

En algunas realizaciones hay una disminución en el tiempo total de clarificación.

- 5 En algunas realizaciones hay un tiempo total de separación de la papilla disminuido, como una disminución de al menos el 5%, al menos el 10% o al menos el 15% en comparación con un control sin enzima, o al menos el 2,5%, al menos el 5% o al menos el 10% en comparación con un control que usa LAMINEX® Super.

En algunas realizaciones hay un ΔP promedio a través del lecho del filtro disminuido durante la recirculación de la papilla sobre el lecho del filtro y/o durante el proceso de clarificación.

- 10 Se debe entender que ΔP se refiere a la caída de presión a través del lecho.

En algunas realizaciones hay un ΔP promedio a través de la superficie de separación disminuido durante la recirculación de la papilla sobre el lecho del filtro y/o durante el proceso de clarificación.

- 15 En algunas realizaciones hay una disminución en el ΔP promedio a través de la superficie de separación durante el proceso de separación de la papilla, como una disminución de al menos el 5%, al menos el 10% o al menos el 15% en comparación con un control sin enzima, o con un control que usa LAMINEX® Super.

En algunas realizaciones no hay cambio en la turbidez del mosto.

En algunas realizaciones hay una reducción en los pentosanos del mosto.

En algunas realizaciones hay un rendimiento del extracto mejorado.

En algunas realizaciones hay un aumento del caudal durante la filtración de la cerveza.

- 20 En algunas realizaciones hay una disminución en la acumulación de presión a través del filtro a lo largo del tiempo durante la filtración de la cerveza, como una disminución de al menos el 10%, al menos el 20% o al menos el 25% en comparación con un control sin enzima, o con un control que usa LAMINEX® Super.

- 25 En algunas realizaciones hay una disminución en la turbidez de la cerveza, como una disminución de al menos el 10%, al menos el 20% o al menos el 25% en comparación con un control sin enzima, o con un control que usa LAMINEX® Super.

En algunas realizaciones no hay disminución en la estabilidad de la espuma.

En algunas realizaciones hay un β -glucano de cerveza disminuido, como una disminución de al menos el 10%, al menos el 20% o al menos el 25% en comparación con un control sin enzima, o con un control que usa LAMINEX® Super.

- 30 En algunas realizaciones hay una disminución en los pentosanos de la cerveza, como una disminución de al menos el 10%, al menos el 20% o al menos el 25% en comparación con un control sin enzima.

- 35 En algunas realizaciones se usa menos de aproximadamente 0,5 kg de complejo enzimático por tonelada de molienda en un proceso para la producción de papilla cervecera, como en la producción de una bebida de cerveza de malta y/o en una producción de whisky. En algunas realizaciones se usan menos de aproximadamente 0,4 kg de complejo enzimático por tonelada de molienda, como se usa menos de aproximadamente 0,3 kg de complejo enzimático por tonelada de molienda, como se usa menos de aproximadamente 0,25 kg de complejo enzimático por tonelada de molienda, como se usa menos de aproximadamente 0,2 kg de complejo enzimático por tonelada de molienda, como se usa menos de aproximadamente 0,19 kg de complejo enzimático por tonelada de molienda, como se usa menos de aproximadamente 0,18 kg de complejo enzimático por tonelada de molienda, como se usa menos de aproximadamente 0,17 kg de complejo enzimático por tonelada de molienda, como se usa menos de aproximadamente 0,16 kg de complejo enzimático por tonelada de molienda, como se usa menos de aproximadamente 0,15 kg de complejo enzimático por tonelada de molienda, como se usa menos de aproximadamente 0,14 kg de complejo enzimático por tonelada de molienda, como se usa menos de aproximadamente 0,13 kg de complejo enzimático por tonelada de molienda, como se usa menos de aproximadamente 0,12 kg de complejo enzimático por tonelada de molienda, como se usa menos de aproximadamente 0,11 kg de complejo enzimático por tonelada de molienda.

- 50 Se debe entender que una cepa fúngica usada de acuerdo con la invención puede ser un cultivo de la cepa depositada mencionada anteriormente, pero también puede ser un cultivo de una cepa que tiene propiedades sustancialmente idénticas a la cepa aislada y depositada mencionada anteriormente. En una realización preferida la cepa es la cepa depositada o una progenie de esta.

El producto de expresión obtenido por fermentación de una especie del género *Trichoderma* usada de acuerdo con la presente invención se deriva de *Trichoderma reesei*, como la composición Celluclast® disponible en Novozymes A/S. Celluclast® tiene un pronunciado efecto reductor de la viscosidad en sustratos celulósicos solubles. Alternativamente, se puede usar LAMINEX® BG, una preparación de celulasa comercial producida por *Trichoderma reesei* y disponible en Danisco A/S.

El producto de expresión obtenido por fermentación de una especie del género *Penicillium* usada de acuerdo con la presente invención se deriva de *Penicillium funiculosum*. En algunas realizaciones la cepa es *Penicillium funiculosum* depositada bajo el tratado de Budapest en el Instituto Micológico Internacional bajo el número IMI 378536 o un derivado o progenie de esta. Alternativamente el *Penicillium funiculosum* es como se describe en el documento WO9957325.

En algunas realizaciones alternativas se usa LAMINEX® C2K (obtenido de Danisco A/S), un producto de expresión derivado de *Penicillium funiculosum*, de acuerdo con la invención.

LAMINEX® Super es un producto enzimático de la elaboración de la cerveza para usar en la papilla para ayudar en la clarificación o la filtración de la papilla. El producto LAMINEX® Super es una mezcla de dos productos enzimáticos diferentes de fermentación- la celulasa de *Penicillium funiculosum* y la celulasa de *Trichoderma reesei*. LAMINEX® Super se obtiene de Danisco A/S. Se incluye el componente de *Penicillium funiculosum* para hidrolizar β-glucanos y xilanos solubilizados, reducir la viscosidad del mosto y mejorar la clarificación o filtración de la papilla; se incluye el componente de *Trichoderma reesei* para tener una baja medida de β-glucano (mediante el procedimiento del Ensayo Megazyme Mixed-linkage Beta-glucan) en el mosto y aumentar la tasa de filtración de la cerveza.

LAMINEX® BG- Producto(s) de *T. reesei* usado(s) para mejorar la filtración de la cerveza obtenido de Danisco A/S.

El producto LAMINEX® Super se define como compuesto por:

1575 u/g (determinado por el "Ensayo 1") de *Penicillium funiculosum* concentrado;

2362 u/g (determinado por el "Ensayo 1") de *Trichoderma reesei*.

Esto se redondeó hacia abajo hasta 3900 u/g en la especificación final del producto LAMINEX® Super.

La especificación del LAMINEX® Super es:

Actividad celulasa ≥3900 u/g (determinado por el "Ensayo 1")

pH 3,7 – 4,2

Las micro. especificaciones serán estándar

Estabilizado con benzoato de sodio al 0,25%.

El LAMINEX® XG se define como compuesto por:

un complejo enzimático derivado de una combinación de un producto de expresión obtenido por fermentación de la especie *Trichoderma reesei* y un producto de expresión obtenido por fermentación de la especie *Penicillium funiculosum*, en donde la relación entre la actividad beta-1,4-endoglucan hidrolasa derivada de *Penicillium funiculosum* y la de *Trichoderma reesei* es de aproximadamente 0,25/0,75 a 0,37/0,63, como un complejo enzimático en donde:

aproximadamente 2363 u/g (actividad medida por el "Ensayo 1") se derivan de *Penicillium funiculosum* concentrado; y

aproximadamente 5315 u/g (actividad medida por el "Ensayo 1") se derivan de *Trichoderma reesei*. En esta realización particular, el producto LAMINEX® XG proporciona una relación de *Penicillium funiculosum*/*Trichoderma* de 0,31/0,69 basada en la actividad U medida por el "Ensayo 1" como se describe en "Ensayos".

Ejemplo 1

Estudio de la papilla a escala de laboratorio 1

Actividades enzimáticas:

El producto LAMINEX® Super mezclado para este experimento específico:

- 5 Actividad nominal: 3937 CMC U/g. Actividad medida: 3682 CMC U/g (actividad medida por el método del "Ensayo 1") dosificada a 0,2 kg/tonelada de molienda para dar 736400 CMC U/tonelada de molienda (= 0,736 U/g de molienda).

Dada la definición del producto LAMINEX® Super de 0,40 x producto de *P. funiculosum* y 0,60 x producto de *T. reesei* basado en la actividad CMC según lo medido por el "Ensayo 1":

- contribución de la actividad de *P. funiculosum* – 0,295 CMC U/g de molienda

- 10 - contribución de la actividad de *T. reesei* – 0,442 CMC U/g de molienda.

LAMINEX® Super (0,200 kg/tonelada de molienda) + 50% de la actividad del componente de *T. reesei* (El LAMINEX® XG):

- 15 3682 CMC U/g (actividad medida por el "Ensayo 1") dosificada a 0,2 kg/tonelada de molienda + 0,09534 g del componente de *T. reesei* (12539 CMC U/g, por el "Ensayo 1")/g del producto LAMINEX® Super que proporciona 975494 U/tonelada de molienda (= 0,975 U/g de molienda)

- contribución de la actividad de *P. funiculosum* – 0,295 CMC U/g de molienda

- contribución de la actividad de *T. reesei* – (0,442 + 0,239) CMC U/g de molienda = 0,681 CMC U/g de molienda.

La relación de la contribución *P. funiculosum*/*T. reesei* en el estudio de la papilla a escala de laboratorio 1- 0,30/0,70.

- 20 Prueba de LAMINEX® Super (0,200 kg/tonelada de molienda) frente a LAMINEX® Super (0,200 kg/tonelada de molienda) + 50% de la actividad del componente de *T. reesei* en una papilla de cebada de Fawcett al 10% (90% de malta de Fawcett: 10% de cebada de Fawcett): - 50 g de molienda en un total de 250 g de agua. Perfil de maceración: se usaron 50 g de molienda mezcla a 0,5 mm y se añadieron 190 ml de agua a 67°C. El ciclo de temperatura de maceración fue de 60 minutos a 65°C, después 10 minutos a 72°C. Las papillas se enfriaron entonces, se llevaron hasta 250 de en peso y se filtraron a través de papeles de filtro estriados (Ederol 12).

- 25 En comparación con el producto LAMINEX® Super la solución de enzima de LAMINEX® Super (0,200 kg/tonelada de molienda) con el 50% de actividad extra añadida del componente de *T. reesei* mostró:

- β -glucano residual del mosto reducido (véase la figura 1)

El β -glucano residual del mosto reducido indica un potencial de viscosidad reducida y seguido de una separación/filtración del mosto aumentada y un potencial de aumento de los ciclos de cocción/día.

- 30 • Filtración aumentada (véase la figura 1)

La filtración aumentada indica el potencial positivo de una duración aumentada de los ciclos de filtración sin interrupciones (p. ej., transvase) que a su vez podría disminuir el tiempo total de filtración y, por lo tanto, dar como resultado un aumento en los ciclos de cocción/día.

Ejemplo 2 (no de acuerdo con la invención)

- 35 Estudio de la papilla a escala de laboratorio 2

Actividades enzimáticas:

LAMINEX® Super:

4380 CMC U/g (actividad calculada a partir de la contribución de un solo componente) dosificada a 0,2 kg/tonelada de molienda dando 876000 CMC U/tonelada de molienda (= 0,876 U/tonelada de molienda).

- 40 El componente de *P. funiculosum* que contribuye con 2069 CMC U/g (por el "Ensayo 1") que corresponde a 0,414 U/g de molienda.

El componente de *T. reesei* que contribuye con 2311 CMC U/g (por el "Ensayo 1") que corresponde a 0,462 U/g de molienda.

La relación de la contribución *P. funiculosum*/*T. reesei* en el producto LAMINEX® Super en este estudio es 0,47/0,52.

El LAMINEX® XG (LAMINEX® Super concentrado 1,5 veces + un 50% de actividad extra adicional del componente de *T. reesei*):

8304 CMC U/g (actividad calculada a partir de la contribución de un solo componente) dosificada a 0,133 kg/tonelada de molienda dando 1104432 CMC U/tonelada de molienda (= 1,104 U/tonelada de molienda).

5 El componente de *P. funiculosum* que contribuye con 3104 CMC U/g (por el “Ensayo 1”) que corresponde a 0,413 U/g de molienda.

El componente de *T. reesei* que contribuye con 5200 CMC U/g (por el “Ensayo 1”) que corresponde a 0,692 U/g de molienda.

10 La relación de la contribución *P. funiculosum*/*T. reesei* en el estudio de la papilla LAMINEX® XG a escala de laboratorio 2 - 0,37/0,63.

Prueba de LAMINEX® Super (0,200 kg/tonelada de molienda) frente a LAMINEX® XG (0,133 kg/tonelada de molienda) en la molienda mezclada – 25,8% de malta Spitz y 74,2% de malta Pilsner- papilla. Perfil de la papilla: se trituraron 50 g de molienda con 150 g de agua y se siguió el programa de la papilla dado en la Tabla 1:

Tabla 1. Programa de papilla a escala de laboratorio:

Programa de maceración

Pre-maceración	a 50°C	más de 10 minutos
Reposo	a 50°C	durante 20 minutos
Calentamiento	a 65°C	más de 15 minutos
Reposo	a 65°C	durante 30 minutos
Calentamiento	a 76°C	más de 15 minutos
Reposo	a 76°C	durante 15 minutos y después aplastar

15 Al final de la trituración, se añadieron 30 ml de agua caliente (a 76°C) a cada papilla y las papillas se filtraron en caliente usando papeles de filtro Ederol 12.

En comparación con el producto LAMINEX® Super (dosificado a 0,2 kg/tonelada de molienda) la solución de enzima de LAMINEX® XG (dosificada a 0,133 kg/tonelada de molienda) mostró:

- Concentraciones de β -glucano residual en el mosto reducidas (véase la Figura 2)

20 La importancia de reducir la concentración de β -glucano en el mosto no está clara, sin embargo, las teorías asocian el β -glucano reducido en el mosto con viscosidades del mosto reducidas. Con la separación de la papilla como el cuello de botella del proceso de elaboración de la cerveza, el aumento positivo resultante podría aumentar la capacidad de la sala de cocción aumentando el número de ciclos de cocción/día debido a la disminución del tiempo dedicado a la separación de la papilla.

25 • Volúmenes de filtración aumentados a lo largo del tiempo (véase la Figura 2)

Las tasas de filtración más altas disminuyen positivamente el tiempo empleado en la filtración, lo que potencialmente da como resultado un aumento en la capacidad de la sala de cocción aumentando el número de ciclos de cocción/día.

- Viscosidad del mosto reducida (véase la Figura 2)

30 La viscosidad reducida del mosto tiene el potencial positivo de aumentar las tasas de filtración y, por lo tanto, de aumentar la capacidad de la sala de cocción.

Ejemplo 3 (no de acuerdo con la invención)

Pruebas piloto en la elaboración de la cerveza

Las mismas composiciones enzimáticas que en el estudio de la papilla a escala de laboratorio 2.

35 Prueba del LAMINEX® Super (0,200 kg/tonelada de molienda equivalente) y LAMINEX® XG (LAMINEX® Super concentrado 1,5 veces + 50% de actividad extra adicional del componente de *T. reesei*) (0,133 kg/tonelada de molienda). El estudio piloto de maceración de elaboración de la cerveza se realizó con 31 kg de molienda mezclada – 25,8% de malta Spitz y 74,2% de malta Pilsner – en un volumen de papilla de 110 l. El perfil de maceración se ve en la Tabla 2.

Tabla 2. Perfil de maceración de elaboración de cerveza piloto

Etapa	Tiempo	Tiempo total	Temperatura
	(min.)	(min.)	(grados C)
	0	0	50
Pre-maceración	10	10	50
Reposo	20	30	50
Calentamiento	15	45	65
Reposo	30	75	65
Calentamiento	15	90	76
Reposo	15	105	76

Ensayos piloto de maceración de elaboración de la cerveza

En comparación con LAMINEX® Super, la adición de LAMINEX® XG en el proceso de maceración da como resultado:

- Disminución del tiempo de purga hasta en un 13% (véase Tabla 3)

5 La disminución del tiempo de purga contribuye positivamente a una disminución del tiempo dedicado a la separación del mosto y, por lo tanto, es un potencial para aumentar la capacidad de la sala de cocción por un aumento en el número de ciclos de cocción/día.

- Tiempo total de clarificación disminuido hasta en un 8% en comparación con LAMINEX® Super y hasta en un 20% en comparación con el control de agua (sin enzima añadida) (véase Tabla 3 y Figura 3)

10 Con el proceso de clarificación siendo el cuello de botella del proceso de elaboración de la cerveza, disminuir el tiempo de clarificación tiene el potencial de aumentar la capacidad de la sala de cocción aumentando el número de ciclos de cocción/día.

- Caudal promedio aumentado ya sea calculado como el promedio de los caudales medidos “de manera continua” durante el proceso de clarificación o como el “volumen total filtrado” por el “tiempo total de clarificación” (véase Tabla 3 y Figura 3).

15 El caudal promedio aumentado podría disminuir positivamente el tiempo total empleado en la separación del mosto y, por lo tanto, aumentar potencialmente la capacidad de la sala de cocción.

- ΔP promedio a través del lecho del filtro disminuido hasta en un 19% durante el proceso de clarificación (véase Tabla 3).

20 Potencialmente, un ΔP promedio a través del lecho del filtro disminuido podría dar como resultado una menor necesidad de decantación por lecho filtrante y aumentar el volumen de filtrado a lo largo del tiempo. Ambos factores tienen el potencial positivo de disminuir el tiempo de clarificación y, por lo tanto, de aumentar la capacidad de la sala de cocción.

- Presión acumulada disminuida durante la recirculación de la papilla a través del lecho filtrante (de hasta un 22%) y durante la clarificación (de hasta un 24%) (véase Tabla 3).

25 Tanto la disminución de la presión acumulada durante la recirculación como de la clarificación tienen el potencial de contribuir al aumento de la filtración y, por lo tanto, disminuir el tiempo total de clarificación. De nuevo esto podría dar como resultado una mayor capacidad de la sala de cocción. El efecto observado es especialmente fuerte ya que una tasa de filtración aumentada normalmente estaría vinculada a un aumento de la presión – y los datos actuales muestran un aumento en la filtración y, al mismo tiempo, una disminución de la presión acumulada.

- Ningún cambio en la turbidez del mosto (véase Tabla 3).

30 La turbidez no cambia, lo que es positivo, ya que una turbidez aumentada podría ser un factor que de como resultado la elección de la inducción de la decantación. La decantación requiere mucho tiempo y aumentaría el tiempo total de la separación del mosto y, por lo tanto, aumentaría la capacidad de la sala de cocción.

35

- “presión acumulada total” disminuida durante la clarificación hasta en un 24% (véase Tabla 3 y Figura 3).

La “presión acumulada total” disminuida durante la separación del mosto aumentaría la tasa de filtración y, por lo tanto, aumentaría la capacidad de la sala de cocción por disminución del tiempo empleado en el proceso de separación del mosto.

- 5
- Ausencia de decantación por lecho filtrante inducida por la acumulación de presión. Según lo marcado por (1) en la parte inferior de la Tabla 3, solo se introdujo la decantación obligatoria cuando se incluye LAMINEX® XG en la etapa de maceración (marcado por (1) en la Tabla 3).

Disminuir el tiempo de purga contribuye a la disminución del tiempo total de clarificación y un potencial aumento en el número de ciclos de cocción/día.

10 **Tabla 3. Ensayos piloto de maceración de elaboración de la cerveza- resumen de datos de clarificación**

		Control	LAMINEX® Super	LAMINEX® XG
Fecha		16-oct-08	21-oct-08	28-oct-08
Nº de elaboración:		73	75	79
Malta Pilsner	(kg)	23,0	23,0	23,0
Malta Spitz	(kg)	8,0	8,0	8,0
Molienda total	(kg)	31,0	31,0	31,0
Tiempo primer mosto	(min.)	35,50	25,00	25,50
Tiempo 1ª purga	(min.)	8,00	7,50	7,50
Tiempo 2ª purga	(min.)	6,00	17,00	11,17
Tiempo 3ª purga	(min.)	16,50	6,00	5,83
Tiempo 4ª purga	(min.)	6,50	6,00	6,00
Tiempo 5ª purga	(min.)	7,50	8,00	8,17
Tiempo de purgas	(min.)	44,50	44,50	38,67
Tiempo total de clarificación	(min.)	80,00	69,50	64,17
Caudal promedio	(l/h)	126,3	136,8	139,4
Caudal promedio*	(l/h)	111,8	128,6	139,3
ΔP promedio	(barg)	169	179	145
P acumulada- recirculación	(barg)	104	93	73
P acumulada- clarificación	(barg)	555	396	300
P acumulada- total	(barg)	659	489	373
Decantaciones (1 ^{er} mosto + purgas)**		1+1	0+1	0+(1)

* A partir del volumen total y del tiempo total de clarificación

** 1 significa decantación inducida por aumento de presión, 0 significa sin decantación, (1) significa decantación obligatoria inducida manualmente al comienzo de la 2ª purga si no había ninguna antes.

Los análisis de muestras de mosto de papillas con LAMINEX® XG añadido en el proceso de maceración dieron como resultado:

- β-glucano en el mosto disminuido según lo medido por el Método Megazyme Mixed Linkage Beta-Glucan (referencia del catálogo de Megazyme K-BGLU que cumple con el método AOAC estándar 995.16 (véase Tabla 4).

El β -glucano en el mosto disminuido puede dar como resultado una positiva disminución en la viscosidad del mosto, aumentando así la filtración y la capacidad de la sala de cocción aumentando el número de ciclos de cocción/día.

- Extracto aumentado hasta en un 2,3% (véase Tabla 4).

5 Un aumento en el extracto daría un aumento positivo en el rendimiento interno de la sala de cocción – más producto producido a partir de la misma cantidad de materia prima- en otros términos, una capacidad de la sala de cocción aumentada de una manera más rentable.

Tabla 4. Análisis del mosto en la elaboración de cerveza piloto:

Ensayo nº.	Muestra	Extracto	[β -Glucano]
		(°P)	(mg/l)
73	Mosto combinado	14,11	1163
75	Mosto combinado	14,18	588
79	Mosto combinado	14,34	187
73: Control negativo: sin control de enzima 75: LAMINEX® Super a 0,20 kg/tonelada 79: LAMINEX® XG a 0,133 kg/tonelada			

Filtración de cerveza de elaboración de cerveza piloto

En comparación con LAMINEX® Super, la adición de LAMINEX® XG en el proceso de maceración da como resultado:

- 10
- Caudal aumentado durante la filtración de la cerveza (véase Tabla 5)

El caudal aumentado durante la filtración de la cerveza tiene el efecto positivo de aumentar la capacidad de filtración y, por lo tanto, potencialmente disminuir (limitar) las necesidades de capacidad del tanque de cerveza extra brillante (BBT) (BBT son los tanques de presión usados para el almacenamiento de la cerveza después de la filtración hasta el llenado. Estos tanques son capaces de mantener una presión estable, evitar la pérdida de dióxido de carbono y prevenir la formación de espuma).

- 15
- Disminución significativa en la acumulación de presión a través del filtro a lo largo del tiempo (véase Tabla 5). La disminución en la acumulación de presión a través del filtro a lo largo del tiempo aumenta positivamente la duración del ciclo de filtración entre limpiezas. Esto limita positivamente la limpieza en el lugar, el consumo de agua y energía. También se reduce la cantidad de material de filtro necesaria, lo que se traduce en un ahorro de costes. Ciclos de filtración más largos entre limpiezas reducen positivamente la pérdida de cerveza que se produce al arrancar y detener el proceso de filtración de la cerveza.
- 20

Tabla 5. Resumen de datos de filtración de cerveza de cervecería piloto

73			75			79		
Volumen	Flujo	ΔP	Volumen	Flujo	ΔP	Volumen	Flujo	ΔP
(l)	(l/h)	(barg)	(l)	(l/h)	(barg)	(l)	(l/h)	(barg)
0,0	95,0	1,90	0,0	106,0	1,70	0,0	130,0	1,00
2,0	60,0	4,20	5,0	115,0	2,60	5,0	120,0	1,00
3,0	125,0	2,30	10,0	123,0	3,20	10,0	116,0	0,80
7,0	115,0	2,50	15,0	118,0	3,50	14,0	116,0	1,40
11,0	109,0	4,20	20,0	119,0	3,90	18,0	119,0	1,60
15,0	81,0	4,10	25,0	116,0	4,20	22,0	118,0	1,85
20,0	64,0	4,10	30,0	105,0	4,30	26,0	119,0	2,10
25,0	52,0	4,10	35,0	99,0	4,30	30,0	119,0	2,20
30,0	22,0	4,20	40,0	92,0	4,20	34,0	120,0	2,30

73			75			79		
Volumen	Flujo	ΔP	Volumen	Flujo	ΔP	Volumen	Flujo	ΔP
(l)	(l/h)	(barg)	(l)	(l/h)	(barg)	(l)	(l/h)	(barg)
32,0	8,0	4,20				38,0	118,0	2,45
33,0	0,0	4,20				42,0	117,0	2,60
						44,0	117,0	2,75
73: Control negativo: sin control de enzima 75: LAMINEX® Super a 0,20 kg/tonelada 79: LAMINEX® XG a 0,133 kg/tonelada								

Análisis de cerveza de cervecería piloto

Los análisis de cerveza producidos a partir de papillas con LAMINEX® XG añadido en el proceso de maceración muestran:

- Beta-glucano de la cerveza disminuido (véase Tabla 6)
- 5 El β-glucano de la cerveza disminuido podría disminuir positivamente la viscosidad de la cerveza y, por lo tanto, aumentar el ciclo de filtración y reducir el filtro de ayuda y el consumo de servicios (ahorro de costos).
- Turbidez de la cerveza disminuida (véase Tabla 6)

10 El principal contribuyente de la turbidez de la cerveza puede estar relacionado con material no beta-glucano. El β-glucano de la cerveza disminuido podría también contribuir positivamente a la disminución de la turbidez de la cerveza, lo que da una apariencia positiva a la cerveza.

- Estabilidad de la espuma no disminuida (véase Tabla 6 – Valor de retención de la cabeza de una buena espuma)

La estabilidad de la espuma de la cerveza no disminuyó usando el “LAMINEX® Super conc. 1,5 veces + 50% de actividad extra adicional del componente de *T. reesei*”. Esto es positivo ya que sería un factor de compromiso en lo que respecta a la apariencia y calidad de la cerveza.

- 15
- Podría esperarse una disminución de los pentosanos de la cerveza

La disminución de los pentosanos de la cerveza podría contribuir positivamente al aumento de la filtración de la cerveza

Tabla 6. Análisis de cerveza de cervecería piloto:

	73 Control	75 Estándar	79 Prueba
Gravedad específica	1,0101	1,0114	1,0111
[□□-Glucano] (mg/l)	389	209	133
Turbidez: Radiómetro (EBC)	2,70	1,55	1,00
Turbidez: Retención de la cabeza de Hach (EBC)	2,40	1,13	0,68
Valor (s)	90	108	136
Prueba de envejecimiento forzado (EBC)	1,80	0,25	0,20
73: Control negativo: sin control de enzima 75: LAMINEX® Super a 0,20 kg/tonelada 79: LAMINEX® XG a 0,133 kg/tonelada			

Ejemplo 4

Estudios de cervecería a gran escala

Línea de prueba 1:

5 El ensayo se realizó con una composición de molienda de Cebada del 31,6% usando 9500 kg de molienda por elaboración (3000 kg de Cebada, 6500 kg de Malta).

Como se demuestra en la Tabla 7, se observaron buenos resultados con LAMINEX® XG con respecto a la separación de la papilla. Disminuir el tiempo de clarificación tiene el potencial de aumentar la capacidad de la sala de cocción aumentando el número de ciclos de cocción/día.

Tabla 7. Rendimiento de la sala de cocción en la separación de la Papilla.

LAMINEX®	kg/cocción	SALA DE COCCIÓN	
		Tiempo de separación de la papilla, AU	Tiempo total de separación de la papilla, AU
I- Control			
Super	2	100	129
Super	2	108	100
II- Prueba			
XG	1,4	93	86
XG	1,4	94	87
AU – Unidad Arbitraria			

10 Línea de prueba 2:

El ensayo se realizó con una composición de molienda de Cebada del 28% usando 12300 kg de molienda por cocción (3500 kg de Cebada, 8800 kg de Malta).

Como se demuestra en la Tabla 8, se observaron buenos resultados con LAMINEX® XG con respecto a la filtración de cerveza.

15 • Aumentar los ciclos de filtración de cerveza entre limpiezas tiene el potencial de aumentar la capacidad de la sala de cocción reduciendo el tiempo empleado en la limpieza y aumentando el número de ciclos de cocción de filtración de la cerveza/día. Además, aumentar los ciclos de filtración de la cerveza da como resultado un ahorro de costos y un menor consumo de energía y reduce la pérdida de cerveza que se produce al iniciar y detener la filtración de la cerveza.

20 • La reducción del filtro de ayuda y el consumo de servicios públicos (consumo reducido de kieselguhr) da como resultado un ahorro directo de costos.

Tabla 8. Rendimiento de la sala de cocción en la filtración de la cerveza.

LAMINEX®	kg/cocción	FILTRACIÓN DE LA CERVEZA	
		Ciclo de filtración, AU	Consumo kieselguhr, AU
I- Control			
Super	2	100	100
II- Prueba			
XG	1,4	148	48
XG	1,4	138	76
AU – Unidad Arbitraria			

• Como se presenta en la Tabla 9, los análisis de la cerveza producida a partir de la Línea 2 con LAMINEX® XG añadido en el proceso de maceración mostraron: Beta-glucano de la cerveza disminuido.

El β -glucano de la cerveza disminuido podría positivamente disminuir la viscosidad de la cerveza y, por lo tanto, aumentar el ciclo de filtración y reducir el filtro de ayuda y el consumo de servicios (ahorro de costos).

- Se podrían esperar los pentosanos de la cerveza reducidos.

5 Los pentosanos de la cerveza disminuidos podrían contribuir positivamente al aumento de la filtración de la cerveza reduciendo la viscosidad.

- Viscosidad dinámica de la cerveza reducida.

La viscosidad dinámica de la cerveza reducida podría aumentar positivamente los ciclos de filtración y reducir el filtro de ayuda y el consumo de servicios (ahorro de costos). El aumento de los ciclos de filtración podría aumentar también la capacidad de la sala de cocción aumentando el número de ciclos de filtración de la cerveza/día.

10 Tabla 9. Análisis de cerveza de cervecería a gran escala, Línea 2

Análisis (Unidades arbitrarias)	LAMINEX® Super - 0,163 kg/tonelada de molienda	LAMINEX® Super XG - 0,163 kg/tonelada de molienda
Dyn. Visc. (70,00°)	100	95,7
β -glucano	100	3,30

Resumen- Dosificación de la actividad enzimática usada en los ensayos

Se dan los datos en la relación PF/TR que es justo la relación de contribución de cada componente a la actividad total. PF es la contribución efectuada por *Penicillium funiculosum* y TR la contribución efectuada por *Trichoderma reesei*.

Tabla 10. Actividades enzimáticas CMC usadas en los diferentes ensayos/ejemplos.

	LAMINEX® Super	LAMINEX® XG
	Relación PF/PT	Relación PF/PT
Estudio de papilla a escala de laboratorio 1	0,4/0,6	0,30/0,70
Estudio de papilla a escala de laboratorio 2	0,47/0,52	0,37/0,63
Estudio de cervecería piloto	0,47/0,52	0,37/0,63
Estudio de cervecería a gran escala, Línea 1	0,4/0,6	0,31/0,69
Estudio de cervecería a gran escala, Línea 2	0,4/0,6	0,31/0,69

15 Ensayos

Ensayos 1: Método de actividad celulasa DNS (método DNS CMC)

Nombre sistemático: 1,4-(1,3;1,4)- β -D-glucan 4 glucanohidrolasa

Número IUB: EC 3.2.1.4

Principio

20 El ensayo de celulasa se basa en la endo-hidrólisis enzimática de los enlaces 1,4- β -glucosídicos en la carboximetilcelulosa (CMC), un β -1,4-glucano. Los productos de la reacción (oligosacáridos de β -1,4 glucano) se determinaron colorimétricamente midiendo el aumento resultante en grupos reductores usando un reactivo de ácido 3,5-dinitrosalicílico. La actividad enzimática se calculó a partir de la relación entre la concentración de grupos reductores, como equivalentes de glucosa, y la absorbancia a 540 nm.

25 El ensayo se llevó a cabo a pH 5,0, pero se puede realizar a diferentes valores de pH para la caracterización y especificación adicional de enzimas.

Definición de la unidad

Una unidad de actividad celulasa se define como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de equivalentes de glucosa por minuto en las condiciones del ensayo (pH 5,0 (o como se especifica) y 50°C).

Materiales

- 5 Carboximetilcelulosa. Proveedor: Megazyme Ltd. N° Producto: CM-Celulosa 4CM.
 D-Glucosa "AnalaR". Proveedor: Merck Ltd. (BDH). N° Producto: 10117. M.W.: 180,16
 Acetato sódico *anhidro* "AnalaR". Proveedor: Merck Ltd. (BDH). N° Producto: 10236. M.W.: 82,03
 Ácido acético ("*glacial*") "AnalaR". Proveedor: Merck Ltd. (BDH). N° Producto: 10001. M.W.: 60,05
- 10 Ácido 3,5-dinitrosalicílico GPR (ácido 3,5-dinitro-2-hidroxibenzoico). Proveedor: Merck Ltd. (BDH). N° Producto: 28235
 Hidróxido sódico *pellets* "AnalaR". Proveedor: Merck Ltd. (BDH). N° Producto: 10252. M.W.: 40,00
 Tartrato de sodio y potasio (+) "AnalaR". Proveedor: Merck Ltd. (BDH). N° Producto: 10219. M.W.: 282,22
 Solución de carboximetilcelulosa (CMC) al 1,5% (solución p/v) en tampón acetato sódico 0,1M, pH 5,0 (solución sustrato).
- 15 Solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). 20 g/l de DNS en tampón que contiene 32 g/l de *pellets* de hidróxido sódico y 600 g/l de tartrato de sodio y potasio (+).
 Solución estándar de glucosa (0,5 mg/ml).

Procedimiento

- 20 El complejo enzimático se diluyó en muestras y se hizo una curva de glucosa estándar usando concentraciones de glucosa de 0, 0,125, 0,25, 0,375 y 0,5 mg/ml, como se muestra en la Figura 2.

Se mezclaron 0,25 ml de solución de enzima con 1,75 ml de la solución sustrato (1,5% p/v) a 50°C y la reacción se detuvo después de 10 min mediante la adición de solución de DNS. Esto se continuó calentando a 95°C durante 5 minutos.

Se midió la densidad óptica a 540 nm ($\text{OD}_{540 \text{ nm}}$) de las diferentes muestras.

- 25 Cálculo

La actividad enzimática se determina a partir de la curva estándar como se muestra en la Figura 2.

La actividad se calcula como sigue:

$$\text{Actividad (u.ml}^{-1} \text{ or u.g}^{-1}) = \frac{T - c}{m} \times A \times \frac{1}{180,16} \times 10^3 \times \frac{1}{V} \times \frac{1}{t} \times D$$

donde:

- 30 $T = \Delta\text{OD}_{540 \text{ nm}} \text{ PRUEBA}$

$= \text{OD}_{540 \text{ nm}} \text{ PRUEBA} - \text{OD}_{540 \text{ nm}} \text{ BLANCO}$

$m =$ gradiente de la curva estándar (aproximadamente 1,0)

$c =$ intercepción del eje y de la curva estándar (siempre negativo y aproximadamente -0,02)

180,16 \equiv peso molecular de la glucosa

- 35 $10^3 \equiv$ para convertir a μmoles

$A \equiv$ volumen de ensayo en ml

$V \equiv$ volumen de enzima en ml

$t \equiv$ tiempo de ensayo en minutos

D = factor de dilución real de la enzima (p. ej., para 1,000 g diluido en 1 litro $D = 1000$)

Ensayo 2. Endo-1,4- β -xilanasas (método del xilano de madera de abedul DNS)

Principio

5 La reacción, catalizada por la endo-1,4- β -xilanasas, implica la endohidrólisis de los enlaces 1,4- β -xilósidos en el xilano (p. ej., el xilano de la madera de abedul o xilanos sustituidos del cereal como arabinoxilano de trigo) que forman oligosacáridos de xilano β -1,4.

10 Los productos de la reacción (oligosacáridos de xilano β -1,4) se determinaron colorimétricamente midiendo el incremento resultante de los grupos reductores usando un reactivo de ácido 3,5-dinitrosalicílico. La actividad enzimática se calcula a partir de la relación entre la concentración de grupos reductores, como equivalentes de xilosa, y la absorbancia a 540 nm.

El ensayo estándar se llevó a cabo a pH 3,5, pero se puede realizar a diferentes valores de pH para la caracterización y especificación adicional de enzimas.

Definición de la unidad

15 Una unidad de actividad endo-1,4- β -xilanasas se define como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de equivalentes de xilosa por minuto en las condiciones del ensayo (pH 3,5 (o como se especifica) y 50°C).

Materiales:

Véase la lista de materiales dada anteriormente para el ensayo de actividad de Celulasa.

Xilano de madera de abedul. Proveedor: Sigma Chemical Co. N° de producto: X 0502

$D(+)$ -Xilosa "AnalaR". Proveedor: Merck Ltd. (BDH). N° Producto: 10372. M.W.: 150,13

20 Solución de xilano de madera de abedul al 1,5% (solución p/v) en tampón acetato sódico 0,1 M, pH 4,0 (solución sustrato)

Solución de xilosa estándar (0,50 mg/ml)

Procedimiento

25 Se mezclaron 1,75 ml de solución de xilano de madera de abedul con 0,25 ml de solución de enzima diluida a 50°C durante 10 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de 2 ml de solución de DNS, seguido de calentamiento a 95°C durante 5 minutos. Se midió la densidad óptica a 540 nm ($OD_{540\text{ nm}}$).

Se hizo una curva estándar a partir de 0,125, 0,250, 0,375, 0,500 mg/ml de xilosa.

Cálculo

La actividad se calcula como sigue:

30
$$\text{Actividad (u.ml}^{-1} \text{ or u.g}^{-1}) = \frac{T - c}{m} \times A \times \frac{1}{150.13} \times 10^3 \times \frac{1}{V} \times \frac{1}{t} \times D$$

donde:

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

$$= OD_{540\text{ nm}} \text{ PRUEBA} - OD_{540\text{ nm}} \text{ BLANCO}$$

m = gradiente de la curva estándar (aproximadamente 1,0)

35 c = intercepción del eje y de la curva estándar (siempre negativo y aproximadamente -0,02)

150,13 \equiv peso molecular de la xilosa

$10^3 \equiv$ para convertir a μ moles

$A \equiv$ volumen de ensayo en ml

$V \equiv$ volumen de enzima en ml

40 $t \equiv$ tiempo de ensayo en minutos

D = factor de dilución real de la enzima (p. ej., para 1,000 g diluido en 1 litro $D = 1000$)

Ensayo 3. Laminarinasa (método de la laminarina DNS)

Principio

5 La reacción, catalizada por la laminarinasa, implica la endohidrólisis de los enlaces 1,3-glucosídicos en los 1,3- β -glucanos. Los sustratos incluyen laminarina, paramilón y pachyman. Los productos de la reacción (oligosacáridos de β -1,3-glucano) se determinan colorimétricamente midiendo el incremento resultante en los grupos reductores usando un reactivo de ácido 3,5-dinitrosalicílico. La actividad enzimática se calcula a partir de la relación entre la concentración de grupos reductores, como equivalentes de glucosa, y la absorbancia a 540 nm.

10 El ensayo estándar se llevó a cabo a pH 5,0 a 50°C, pero se puede realizar a diferentes valores de pH y temperatura para la caracterización y especificación adicional de enzimas.

Definición de la unidad

Una unidad de actividad laminarinasa se define como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de equivalentes de glucosa por minuto en las condiciones del ensayo (pH 5,0 y 50°C (o como se especifica)).

Materiales

15 Véase la lista de materiales dada anteriormente para el ensayo de actividad de Celulasa.

Laminarina (de *Laminaria digitata*). Proveedor: Sigma-Aldrich Co. Ltd. N° de producto: L 9634

Solución de laminarina al 1,00% (solución p/v) (solución de sustrato en tampón acetato sódico 0,1 M, pH 5,0)

Se mezclan 1,75 ml de solución de laminarina con 0,25 ml de solución de enzima diluida a 50°C durante 10 minutos y la reacción se detiene mediante la adición de 2 ml de solución de DNS.

20 Se hace una curva estándar usando 0, 0,125, 0,25, 0,5 y 0,75 mg/ml de solución de glucosa.

Cálculo

La actividad se calcula como sigue:

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

donde:

25 $T = \Delta OD_{540 \text{ nm}} \text{ PRUEBA}$

$= OD_{540 \text{ nm}} \text{ PRUEBA} - OD_{540 \text{ nm}} \text{ BLANCO}$

m = gradiente de la curva estándar (aproximadamente 1,0)

c = intercepción del eje y de la curva estándar (siempre negativo y aproximadamente -0,03)

180,16 \cong peso molecular de la glucosa

30 $10^3 \cong$ para convertir a μ moles

$A \cong$ volumen de ensayo en ml

$V \cong$ volumen de enzima en ml

$t \cong$ tiempo de ensayo en minutos

D = factor de dilución de la enzima (p. ej., para 1 g diluido en 1 litro $D = 1000$)

35

Ensayo 4. Ensayo de arabinasa.

Principio

5 El ensayo de actividad de Arabinasa se basa en la determinación colorimétrica midiendo el incremento resultante en los grupos reductores usando un reactivo de ácido 3,5-dinitrosalicílico. La actividad enzimática se calculó a partir de la relación entre la concentración de grupos reductores, como equivalentes de arabinosa, y la absorbancia a 540 nm.

El ensayo estándar se llevó a cabo a pH 3,5, pero se puede realizar a diferentes valores de pH para la caracterización y especificación adicional de enzimas.

Definición de la unidad

10 Una unidad de actividad arabinasa (Arabinasa (endo-1,5-alpha-L-arabinasa)) se define como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de equivalentes de arabinosa por minuto en las condiciones del ensayo (pH 3,5 (o como se especifica) y 50°C).

Materiales

Arabinano de remolacha azucarera Megazyme

Arabinosa Sigma A3131 M.W.: 150,1

15 Acetato sódico *anhidro* "AnalaR". Proveedor: Merck Ltd. (BDH). N° Producto: 10236. M.W.: 82,03

Ácido acético ("*glacial*") "AnalaR". Proveedor: Merck Ltd. (BDH). N° Producto: 10001. M.W.: 60,05

Ácido 3,5-dinitrosalicílico GPR. (ácido 3,5-dinitro-2-hidroxibenzoico). Proveedor: Merck Ltd. (BDH). N° Producto: 28235.

Hidróxido sódico *pellets* "AnalaR". Proveedor: Merck Ltd. (BDH). N° Producto: 10252. M.W.: 40,00

20 Tartrato de sodio y potasio (+) "AnalaR". Proveedor: Merck Ltd. (BDH). N° Producto: 10219. M.W.: 282,22

Solución de Arabinano al 1,5% (solución p/v) en tampón acetato sódico 0,1 M, pH 3,5 (solución sustrato).

Solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). 20 g/l de DNS en tampón que contiene 32 g/l de *pellets* de hidróxido sódico y 600 g/l de tartrato de sodio y potasio (+).

Solución de arabinasa estándar (0,50 mg/ml)

25 Procedimiento

El complejo enzimático se diluyó en muestras y se hizo una curva de glucosa estándar usando concentraciones de arabinasa de 0, 0,125, 0,25, 0,375 y 0,5 mg/ml.

30 Se mezclaron 0,25 ml de solución de enzima con 1,75 ml de solución de sustrato (al 1,5% en p/v) a 50°C y la reacción se detuvo después de 10 min mediante la adición de solución de DNS. Seguimiento de calentamiento a 95°C durante 5 minutos.

Se midió la densidad óptica a 540 nm ($OD_{540\text{ nm}}$) de las diferentes muestras.

Cálculo

La actividad enzimática se determina a partir de la curva estándar.

La actividad se calcula como sigue:

35
$$\text{Actividad (u.ml}^{-1} \text{ or u.g}^{-1}) = \frac{T - c}{m} \times A \times \frac{1}{150.13} \times 10^3 \times \frac{1}{V} \times \frac{1}{t} \times D$$

donde:

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

$= OD_{540\text{ nm}}$ PRUEBA – $OD_{540\text{ nm}}$ BLANCO

m = gradiente de la curva estándar (aproximadamente 1,0)

c = intercepción del eje y de la curva estándar (siempre negativo y aproximadamente -0,02) 150,13 \equiv peso molecular de la arabinasa

$10^3 \equiv$ para convertir a μ moles

$A \equiv$ volumen de ensayo en ml

5 $V \equiv$ volumen de enzima en ml

$t \equiv$ tiempo de ensayo en minutos

D = factor de dilución real de la enzima (p. ej., para 1,000 g diluido en 1 litro $D = 1000$)

Ensayo 5. Ensayo de arabinofuranosidasa

10 La reacción, catalizada por la α -N-arabinofuranosidasa, implica la hidrólisis del enlace terminal, en el residuo no reductor de α -L-arabinofuranósido, de α -L-arabinósidos. La enzima actúa sobre los α -L-arabinofuranósidos, α -L-arabinanos que contienen enlaces (1,3)- y/o (1,5)-, arabinoxilanos y arabinogalactanos.

15 El ensayo de la α -N-arabinofuranosidasa se basa en la hidrólisis enzimática del p-nitrofenil α -L-arabinofuranósido. El ensayo es un método de "dos puntos" en lugar de una "monitorización continua". El cálculo de la actividad enzimática se basa en mediciones tomadas solo al principio y al final del periodo de incubación. El p-nitrofenol, un producto de reacción se determina coloriméricamente (después de ajustar el pH). La actividad enzimática se calcula a partir de la relación entre la concentración de p-nitrofenol y la absorbancia a 400 nm.

Preparación de la solución de enzima diluida:

20 Preparar todas las soluciones de enzima, desde preparaciones de enzima en polvo o líquidas, con agua destilada de vidrio. Minimizar los errores de dilución evitando grandes etapas de dilución que implican pequeños volúmenes o pesos. Al hacer las diluciones de enzimas es más preciso, incluso para una muestra líquida, pesar la muestra de enzima inicial. Si se hace esto, en el caso de muestras líquidas, es necesario medir la gravedad específica del líquido a 20°C.

25 Como el ensayo es un método de "dos puntos" en lugar de una "monitorización continua", es importante asegurar la linealidad dentro de un periodo de incubación con diferentes sistemas y condiciones de enzimas. Bajo las condiciones de ensayo estándar de concentración de sustrato, pH, temperatura y tiempo de ensayo se ha demostrado que el ensayo es lineal en el intervalo $\Delta OD_{540 \text{ nm}}$ PRUEBA (T) = 0,20 – 1,50. Sin embargo, para una buena práctica, el ensayo se realiza dentro de un intervalo definido de $\Delta OD_{540 \text{ nm}}$ PRUEBA (T) = 0,400 – 0,800.

Procedimiento

30 Cada ensayo de muestra de enzima incluye tres análisis: análisis de prueba (PRUEBA) duplicada y un análisis blanco (BLANCO). El procedimiento dado describe el análisis de una muestra de enzima única.

	PRUEBA	BLANCO
Tampón acetato sódico 0,2 M, pH 5,0	1,00 ml	1,00 ml
Agua destilada de vidrio	1,00 ml	1,00 ml
Solución de p-nitrofenil- α -L-arabinofuranósido	1,00 ml	1,00 ml

Se añadieron 0,25 ml de solución de enzima diluida a las soluciones a 50°C, la reacción se detuvo después de 10 minutos mediante la adición de 4 ml de solución de glicina 0,4 M, pH 10,8 (reactivo de parada).

Se midió la absorbancia a 400 nm a 25°C frente a blanco de agua.

- determinar la $OD_{400 \text{ nm}}$ PRUEBA para las PRUEBAS duplicadas medidas;
 - determinar la $OD_{400 \text{ nm}}$ BLANCO.
- 35

Cálculo

$$\Delta OD_{400 \text{ nm}} \text{ PRUEBA (T)} = OD_{400 \text{ nm}} \text{ PRUEBA} - OD_{400 \text{ nm}} \text{ BLANCO}$$

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

$$\text{Actividad (u.ml}^{-1} \text{ o u.g}^{-1}) = \text{Unidades} \times \frac{1}{E} \times D$$

donde:

$$T = \text{OD}_{400 \text{ nm}} \text{ PRUEBA} - \text{OD}_{400 \text{ nm}} \text{ BLANCO}$$

5 18300 = Coeficiente de extinción molar para el p-nitrofenol (camino óptico de 1 cm). V = 7,25 (volumen total de líquido en la prueba en ml)

t = 10 (minutos)

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

E = 0,25 (volumen de la muestra de enzima diluida en ml)

D = factor de dilución de la enzima p. ej., para 1 ml diluido en 1 litro D = 1000)

10 Ensayo 6. Ensayo de celobiohidrolasa.

Principio

La reacción, catalizada por la celobiohidrolasa, implica la hidrólisis de enlaces 1,4-β-D-glucosídicos en celulosa y celotetraosa, lo que libera celobiosa a partir de los extremos no reductores de las cadenas.

15 El ensayo de celobiohidrolasa se basa en la hidrólisis enzimática del p-nitrofenil β-D-celobiopiranosido. El producto de la reacción, p-nitrofenol, se determina colorimétricamente (después de ajustar el pH). La actividad enzimática se calcula a partir de la relación entre la concentración de p-nitrofenol y la absorbancia a 400 nm.

El ensayo se realiza dentro del intervalo lineal definido de $\Delta\text{OD}_{540 \text{ nm}} \text{ PRUEBA (T) = 0,400 - 0,800}$.

Procedimiento

20 Cada ensayo de muestra de enzima implica tres análisis: análisis de prueba (PRUEBA) duplicada y un análisis blanco (BLANCO). El procedimiento dado describe el análisis de una muestra de enzima única.

	<i>PRUEBA</i>	<i>BLANCO</i>
Tampón acetato sódico 0,2 M, pH 5,0	1,00 ml	1,00 ml
Agua destilada de vidrio	1,00 ml	1,00 ml
Solución de p-Nitrofenil- β-D-celobiopiranosido	1,00 ml	1,00 ml

Se añadieron 0,25 ml de solución de enzima diluida a la solución de prueba a 50°C, después de 30 minutos se añadieron 4 ml de solución de glicina 0,4 M, pH 10,8 (reactivo de parada) a cada tubo.

Se midió la absorbancia a 20°C a 400 nm en una cubeta de 1 cm frente a blanco de agua.

- determinar la $\text{OD}_{400 \text{ nm}} \text{ PRUEBA}$ para las PRUEBAS duplicadas medidas;
- 25 • determinar la $\text{OD}_{400 \text{ nm}} \text{ BLANCO}$.

Cálculo

$$\Delta\text{OD}_{400 \text{ nm}} \text{ PRUEBA (T) = OD}_{400 \text{ nm}} \text{ PRUEBA} - \text{OD}_{400 \text{ nm}} \text{ BLANCO}$$

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

$$\text{Actividad (u.ml}^{-1} \text{ o u.g}^{-1}) = \text{Unidades} \times \frac{1}{E} \times D$$

30 donde:

$$T = \text{OD}_{400 \text{ nm}} \text{ PRUEBA} - \text{OD}_{400 \text{ nm}} \text{ BLANCO}$$

ES 2 715 952 T3

18300 = Coeficiente de extinción molar para el p-nitrofenol (camino óptico de 1 cm).

V = 7,25 (volumen total de líquido en la prueba en ml)

1000 = para convertir a litros

10^6 = para convertir a μmol

5 t = 30 (minutos)

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

E = 0,25 (volumen de la muestra de enzima diluida en ml)

D = factor de dilución de la enzima p. ej., para 1 ml diluido en 1 litro D = 1000)

Ensayo 7. Ensayo de β -glucanasa.

10 Principio

La reacción, catalizada por la endo-1,3(4)- β -glucanasa, implica la endohidrólisis de enlaces 1,3- o 1,4- glucosídicos en los β -D-glucanos cuando el residuo de glucosa, cuyo grupo reductor está implicado en el enlace a hidrolizar, está en sí mismo sustituido en C-3. Los sustratos incluyen β -D-glucanos de cereales, laminarina y liquenina. Por definición, esta enzima es diferente de EC 3.2.1.39 (endo-1,3- β -glucanasa o laminarinasa).

15 El ensayo de la endo-1,3(4)- β -glucanasa está basado en la hidrólisis enzimática de los enlaces 1,3- o 1,4- glucosídicos en el β -glucano de cebada, un β -1,3(4)-glucano. Los productos de la reacción (oligosacáridos de β -1,3(4)-glucano) se determinan colorimétricamente midiendo el incremento resultante en grupos reductores usando un reactivo de ácido 3,5-dinitrosalicílico. La actividad enzimática se calcula a partir de la relación entre la concentración de grupos reductores, como equivalentes de glucosa, y la absorbancia a 540 nm.

20 En este ensayo, después de la adición y la mezcla del reactivo DNS, se colocan los tubos de ensayo en un baño de agua hirviendo (95°C como mínimo) y se incuban durante exactamente 15 minutos. Esto contrasta con los ensayos enzimáticos basados en DNS con otros sustratos en los que el periodo de incubación es de 5 minutos. Este cambio también afecta al intervalo de valores de $\Delta\text{OD}_{540\text{ nm}}$ PRUEBA (T) que son aceptables en la prueba.

25 Mientras que el ensayo estándar se lleva a cabo a pH 5,0, se puede realizar a diferentes valores de pH para la caracterización y especificación adicional de enzimas. En este caso solamente se cambia el pH de las soluciones tampón (notificadas a continuación).

Reactivos requeridos

En todos los casos, a excepción del Beta-glucano, es la identidad y la pureza de los reactivos, y no la del proveedor, las que son importantes.

30 Beta-glucano (Cebada; viscosidad media), Megazyme Ltd. N° Producto P-BGBM, Viscosidad: 20 – 30 cSt

D-glucosa "AnalaR". Merck Ltd. (BDH). N° Producto: 10117. M.W.: 180,16

Acetato sódico *anhidro* "AnalaR". Merck Ltd. (BDH). N° Producto: 10236. M.W.: 82,03

Ácido acético ("*glacial*") "AnalaR". Merck Ltd. (BDH). N° Producto: 10001. M.W.: 60,05

Ácido 3,5-dinitrosalicílico GPR. (ácido 3,5-dinitro-2-hidroxibenzoico). Merck Ltd. (BDH). N° Producto: 28235.

35 Hidróxido sódico *pellets* "AnalaR". Merck Ltd. (BDH). N° Producto: 10252. M.W.: 40,00

Tartrato de sodio y potasio (+) "AnalaR". Merck Ltd. (BDH). N° Producto: 10219. M.W.: 282,22

Reactivos

Beta-glucano al 1,5% (solución en tampón acetato sódico 0,1 M, pH 5,0 p/v) (Cebada);

40 Solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS): se disolvieron 10 g de DNS, 16 g de *pellets* de hidróxido sódico, 300 g de tartrato de sodio y potasio (+) en 1000 ml de agua destilada de vidrio

Tampón acetato sódico 1 M, pH 5,0

Solución estándar de glucosa (1,000 mg/ml)

ES 2 715 952 T3

Procedimiento

Cada ensayo de muestra de enzima implica tres análisis: análisis de prueba (*PRUEBA*) duplicada y un análisis blanco (*BLANCO*). También se requiere una curva estándar de glucosa.

- 5 se añadieron 0,25 ml de solución de enzima diluida a 1,75 ml de solución de beta-glucano a 50°C, se añadieron 2 ml de solución de DNS después de 10 minutos y se colocaron los tubos a 95°C como mínimo durante 15 minutos. Se enfriaron a 25°C con agua.

se añadieron 10 ml de agua destilada de vidrio y se midió la densidad óptica a 540 nm ($OD_{540\text{ nm}}$) usando una cubeta de 1 cm de camino óptico.

determinar la $OD_{540\text{ nm}}$ *PRUEBA* para las *PRUEBAS* duplicadas medidas;

- 10 determinar la $OD_{540\text{ nm}}$ *BLANCO*

determinar la $OD_{540\text{ nm}}$ *ESTÁNDARES* para 0,125, 0,250, 0,500, 0,750 mg/ml de *ESTÁNDARES* de glucosa de referencia frente a la muestra *ESTÁNDAR* de glucosa a 0,00 mg/ml (o todas frente al agua).

Cálculo

Determinar $\Delta OD_{540\text{ nm}}$ *PRUEBA* (T) = $OD_{540\text{ nm}}$ *PRUEBA* – $OD_{540\text{ nm}}$ *BLANCO*

- 15 La actividad se calcula como sigue:

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

donde:

$T = \Delta OD_{540\text{ nm}}$ *PRUEBA*

= $OD_{540\text{ nm}}$ *PRUEBA* – $OD_{540\text{ nm}}$ *BLANCO*

- 20 m = gradiente de la curva estándar (aproximadamente 1,0)

c = intercepción del eje y de la curva estándar (siempre negativo y aproximadamente -0,02)

180,16 \equiv peso molecular de la glucosa

$10^3 \equiv$ para convertir a μ moles

$A \equiv$ volumen de ensayo en ml 2,00 ml usados

- 25 $V \equiv$ volumen de enzima en ml 0,25 ml usados

$t \equiv$ tiempo de ensayo en minutos 10 minutos usados

D = factor de dilución de la enzima (p. ej., para 1g diluido en 1 litro $D = 1000$)

REIVINDICACIONES

1. Un complejo enzimático que tiene actividad beta-1,4-endoglucan hidrolasa que comprende:

a. un producto de fermentación de *Trichoderma reesei*; y

5 b. un producto de fermentación de *Penicillium funiculosum* que comprende una o más enzimas seleccionadas de una xilanasa (EC 3.2.1.8), una celulasa (EC 3.2.1.4) y una beta-glucanasa (EC 3.2.1.6);

en donde la relación de la actividad beta-1,4-endoglucan hidrolasa de *Penicillium funiculosum* y de *Trichoderma reesei* es de 0,25/0,75 a 0,35/0,65 y en donde la actividad beta-1,4-endoglucan hidrolasa del complejo enzimático se mide usando el siguiente ensayo:

10 una unidad de actividad de celulasa se define como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de equivalentes de glucosa por minuto en las condiciones del ensayo (pH 5,0) y 50°C;

El complejo enzimático se diluye en muestras y se hace una curva estándar de glucosa usando concentraciones de glucosa de 0, 0,125, 0,25, 0,375 y 0,5 mg/ml;

15 Se mezclan 0,25 ml de solución de enzima con 1,75 ml de solución de sustrato (solución de carboximetilcelulosa (CMC) al 1,5% p/v en tampón acetato sódico 0,1 M, pH 5,0) a 50°C y la reacción se detiene después de 10 min mediante la adición de una solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (20 g/l de DNS en tampón que contiene 32 g/l de *pellets* de hidróxido sódico y 600 g/l de tartrato de sodio y potasio (+)). A esto le sigue el calentamiento a 95°C durante 5 minutos;

La densidad óptica se mide a 540 nm (OD_{540 nm}). La actividad enzimática se determina a partir de la curva estándar.

La actividad se calcula como sigue:

20
$$\text{Actividad (u.ml}^{-1} \text{ or u.g}^{-1}) = \frac{T - c}{m} \times A \times \frac{1}{180.16} \times 10^3 \times \frac{1}{V} \times \frac{1}{t} \times D$$

donde:

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

= $OD_{540 \text{ nm}}$ PRUEBA – $OD_{540 \text{ nm}}$ BLANCO

m = gradiente de la curva estándar (aproximadamente 1,0)

25 c = intercepción del eje y de la curva estándar (siempre negativo y aproximadamente -0,02) 180,16 = peso molecular de la glucosa

10^3 = para convertir a μmoles

A = volumen de ensayo en ml

V = volumen de enzima en ml

30 t = tiempo de ensayo en minutos

D = factor real de dilución de la enzima (p. ej., para 1,000 g diluido en 1 litro $D = 1000$).

2. El complejo enzimático de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el producto de expresión obtenido por fermentación de *Penicillium funiculosum* comprende una xilanasa.

35 3. El complejo enzimático de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende una o más actividades enzimáticas seleccionadas de la lista que consiste en endo-1,4-β-xilanasa, endo-1,3(4)- β-glucanasa, celulasa, laminarinasa, endo-1,5- α-L-arabinanasa, beta-D-glucosido glucohidrolasa, β-xilosidasa, celobiohidrolasa, glucan 1,4-beta-glucosidasa, exo-beta-1,4-glucanasa específica de xiloglucano y α-N-arabinofuranosidasa.

40 4. El complejo enzimático de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene una actividad enzimática de al menos 3000 U/g, según lo medido por el ensayo de la reivindicación 1 derivado del producto de fermentación de *Trichoderma reesei*.

5. El complejo enzimático de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene una actividad enzimática total de al menos 4000 U/g según lo medido por el ensayo de la reivindicación 1.

6. Un proceso para la producción de un complejo enzimático, el proceso que comprende las etapas de
- a. fermentación de *Trichoderma reesei* en un medio para obtener un caldo de fermentación;
 - b. fermentación de *Penicillium funiculosum* en un medio para obtener un caldo de fermentación, y
 - c. recuperación y combinación de cada caldo de fermentación derivado de la etapa a) y b) en forma de un caldo libre de células para obtener un complejo enzimático, en donde la relación de la actividad beta-1,4-endoglucan hidrolasa de *Penicillium funiculosum* y de *Trichoderma reesei* es de 0,25/0,75 a 0,35/0,65 en donde la actividad beta-1,4-endoglucan hidrolasa del complejo enzimático se mide mediante el ensayo de la reivindicación 1.
- 5
7. Un complejo enzimático obtenible mediante un proceso de acuerdo con la reivindicación 6.
- 10
8. El uso de un complejo enzimático de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en un proceso para la producción de una papilla de elaboración de cerveza, como en la producción de una bebida de malta, como una cerveza, como una bebida de cerveza de malta y/o en una producción de whisky y/o en una producción de biocombustible.
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde se usa el complejo enzimático en la papilla para ayudar en la clarificación y/o filtración de la papilla y/o filtración de la cerveza.
- 15
10. El uso de un complejo enzimático de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en la producción de jugo de fruta, vino, procesamiento de grano, alcohol biocombustible y alcohol potable.

Figura 1

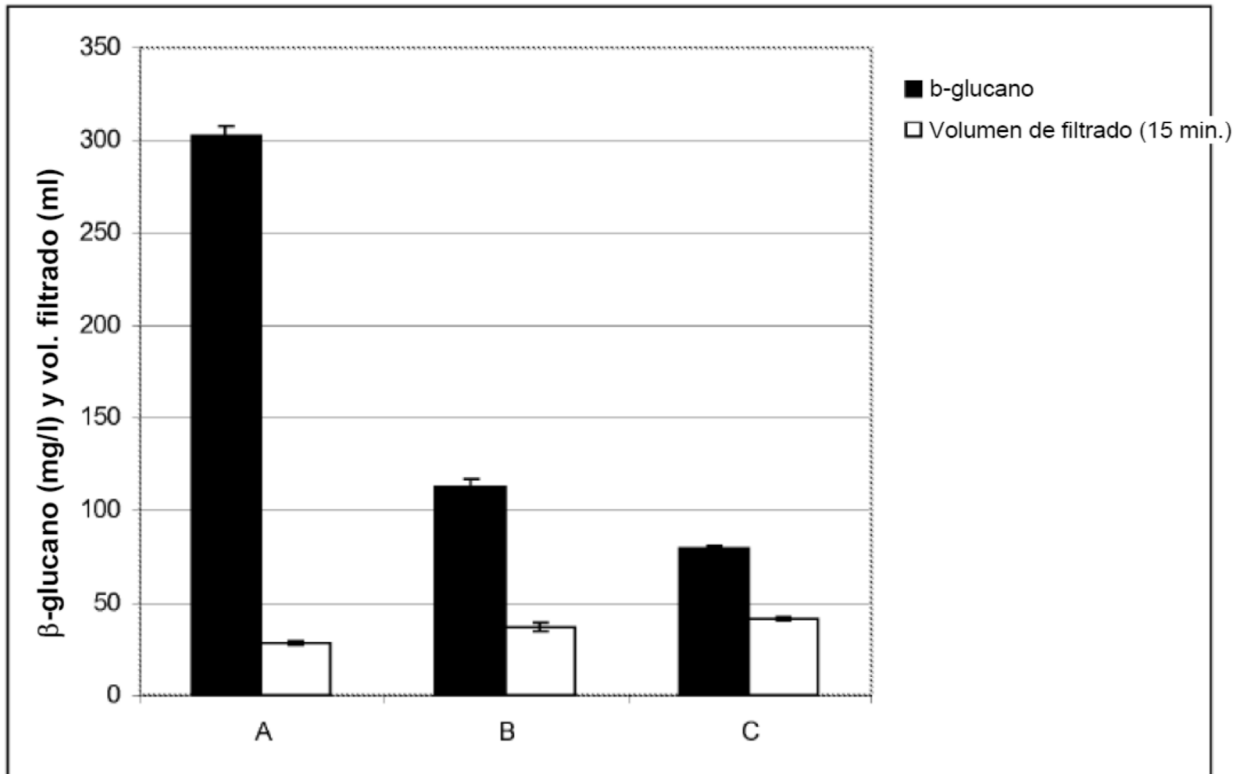


Figura 2

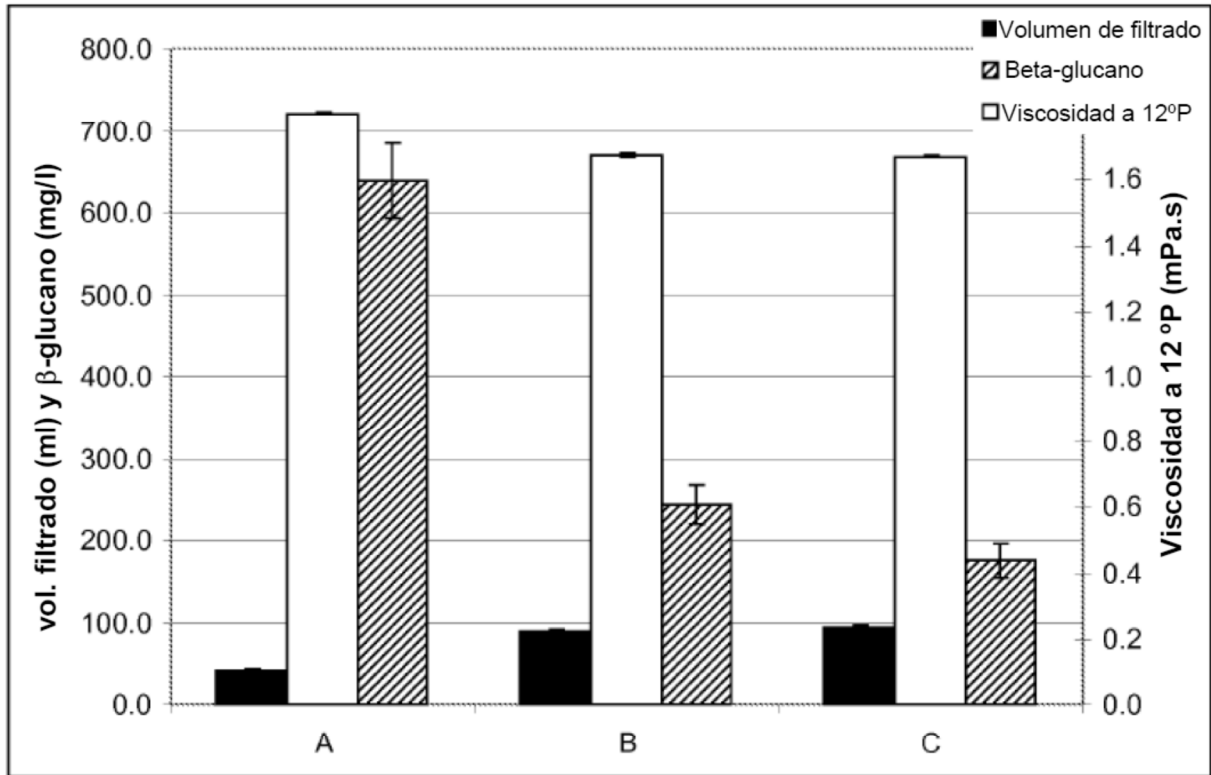


Figura 3

