

400384

18 MAR



P-50.243

93440

Int. Cl.²: C12C

Memoria descriptiva

SECCION TECNICA

CLASIFICACION I. P. C.

CLASE C12

CLASE C

para solicitar PATENTE DE INVENCION

por 20 años

a nombre de A.B.M. INDUSTRIAL PRODUCTS LIMITED

entidad / de nacionalidad ~~de nacionalidad~~ británica

con domicilio en Newark on Trent, Nottinghamshire, Inglaterra

por: "UN METODO PARA LA PRODUCCION DE MOSTO DE CERVEZA"

(Clase Internacional C12c)



Esta invención se refiere a mejoras en o
relacionadas con la producción de mosto para la elabo-
ración de cerveza.

5 En la producción normal del mosto de cerveza,
la malta o una mezcla de malta y grano no malteado se
bracea con agua caliente y seguidamente se filtra. El
filtrado resultante contiene cierta proporción de hidra-
tos de carbono solubles derivados de almidón licuado y
materias nitrogenadas solubles con inclusión de proteí-
10 nas y sus productos de degradación; el filtrado es un me-
dio de fermentación apropiado para la levadura en la pro-
ducción de alcohol. La mayor parte de las materias nitro-
genadas contenidas en el mosto de cerveza se derivan de
la malta, habiéndose preformado durante el procedimiento
15 de malteado. Los hidratos de carbono solubles son el re-
sultado de la acción de los enzimas amilolíticos de la
malta sobre el almidón contenido en la malta y el almi-
dón contenido en el grano no malteado. Así, cualquier gra-
no no malteado utilizado en este método contribuye prin-
cipalmente a la fracción de hidratos de carbono conteni-
20 da en el mosto de cerveza.

El mantenimiento del balance correcto en el
mosto de cerveza entre hidratos de carbono y proteínas
es esencial si se quiere que se produzca una fermentación
25 satisfactoria, pero como los hidratos de carbono no maltea-
dos son más baratos que la malta, la mayoría de los fa-
bricantes de cerveza adoptan la proporción máxima de hi-
dratos de carbono a proteínas en un mosto de cerveza que
sea compatible con la calidad del producto.

30 Recientemente, se han propuesto procedimientos

400384

18 M



5 para la producción de mosto de cerveza que evitan o reducen al mínimo el empleo de la malta, empleando en su lugar α -amilasa comercial y encimas proteolíticos comerciales para degradar las proteínas y el almidón en granos crudos o cocidos.

10 Un enzima comercial es un enzima que se ha producido industrialmente (por ejemplo, por fermentación) formulado adecuadamente para su utilización en procedimientos industriales. El enzima se puede utilizar per se, por ejemplo soportado por un diluyente sólido o en forma de una solución.

15 El tratamiento con la α -amilasa y proteinasa va seguido frecuentemente por un tratamiento con un enzima sacarificante para sacarificar los hidratos de carbono soluble en azúcares fermentables, bien sea mediante el uso de β -amilasa (como en la malta o la soja) o de un enzima de amiloglucosidasa, o de ambos, dependiendo del grado de sacarificación requerido.

20 Es un objeto de la invención proporcionar un método mejorado para la obtención de mosto de cerveza.

25 Se ha encontrado ahora, por ejemplo, que se puede producir ventajosamente mosto de cerveza por el uso de un enzima proteolítico bacteriano comercial y térmicamente estable a una temperatura superior al intervalo normal de operación para los enzimas proteolíticos convencionales, intervalo normal que está comprendido, por ejemplo, entre 50 y 55°C.

30 Sorprendentemente, se ha encontrado que el enzima proteolítico térmicamente estable proporciona una solubilización mejorada de las proteínas cuando se le compara con



los enzimas proteolíticos convencionales.

Asimismo, el almidón se puede licuar y se pueden convertir las proteínas en compuestos solubles que contienen nitrógeno por tratamiento simultáneo con el enzima, proteolítico térmicamente estable y enzima de licuación del almidón a la misma temperatura, estando comprendida la temperatura dentro de un intervalo de operación correspondiente al enzima de licuación del almidón y siendo superior al intervalo normal de operación para los enzimas proteolíticos convencionales; así, el período de digestión se puede reducir en comparación con los procedimientos previamente propuestos en los cuales la licuación del almidón y la conversión de las proteínas se lleva a cabo a temperaturas diferentes.

El enzima proteolítico térmicamente estable tiene una actividad óptima a una temperatura comprendida por ejemplo entre 65°C y 75°C, por ejemplo aproximadamente a 70°C.

Ejemplos de enzimas proteolíticos térmicamente estables incluyen los siguientes:

Proteinasa T (A.B.M. Industrial Products Limited, Woodley, Cheshire, Inglaterra) desarrollada originalmente por Daiwa Kasei K.K., Osaka, Japón, con los nombres de "Termoasa" o "Termolisina".

Astra ST1 (Lake Medel A.B., Suecia)

Astra 1048 (Lake Medel A.B., Suecia)

Alcalasa (Novo Industri A/S, Dinamarca)

Bioprasa (Nagase & Co., Ltd., Osaka, Japón)

D66/72 (A.B.M. Industrial Products Limited).

Se prefiere la Proteinasa T.

400384

18 MAR 1954



5 La invención proporciona un método para la producción de mosto de cerveza a partir de una papilla acuosa de materias vegetales que contienen almidón y proteínas, en el que el almidón se licúa por tratamiento de la papilla con un enzima de licuación del almidón y las proteínas se convierten en compuestos solubles que contienen nitrógeno por tratamiento a una temperatura superior a aproximadamente 55°C con un enzima proteolítico comercial termoestable.

10 La invención proporciona también un método para la producción de mosto de cerveza a partir de una papilla acuosa de materias vegetales que contienen almidón y proteínas, en el que se licúa el almidón y a la misma temperatura se convierten las proteínas en compuestos solubles que contienen nitrógeno por tratamiento simultáneo de la papilla con un enzima de licuación del almidón y un enzima proteolítico comercial térmicamente estable a una temperatura comprendida dentro de un intervalo de operación correspondiente al enzima de licuación del almidón y superior al campo normal de operación correspondiente a los enzimas proteolíticos convencionales.

15 Se ha encontrado que la atenuación o dilución aparente de un mosto de cerveza producido por un método que incorpore la invención se mejora, y que se facilita la fermentación subsiguiente del mosto. Asimismo, se ha encontrado de manera totalmente inesperada que el sabor de la cerveza elaborada a partir de un tal mosto resulta mejorado en comparación con una muestra testigo en la que se haya utilizado un enzima proteolítico convencional. Además, por 20 llevarse a cabo la proteólisis a una temperatura más alta,



se reducen al mínimo los riesgos potenciales de infección.

5 Preferiblemente, el enzima proteolítico se deriva del Bacillus thermoproteolyticus Rokko, por ejemplo la Proteínasa T a que se ha hecho referencia anteriormente en esta memoria.

10 En un método alternativo que incorpora la invención a modo de ejemplo, la licuación del almidón se completa sustancialmente con anterioridad a la conversión de las proteínas, en vez de llevarse a cabo simultáneamente la licuación del almidón y la conversión de las proteínas.

15 Ejemplos de materias vegetales que contienen almidón y proteínas distintas de los cereales incluyen raíces, sustancias fúngicas y sub-productos de procedimientos a los que se hayan sometido cereales.

Ejemplos de materias apropiadas incluyen sorgo, tapioca y arroz, así como trigo, cebada y maíz.

20 La invención proporciona también mosto de cerveza cuando se produce por un método de acuerdo con la invención.

La invención proporciona también un procedimiento para la elaboración de cerveza en el que un mosto de cerveza de acuerdo con la invención se fermenta por medio de levadura.

30 La invención proporciona también cerveza cuando se produce por un tal procedimiento.

400384

18 MAR



La invención proporciona también un procedimiento para la producción de un jarabe de mosto de cerveza en el que se concentra un mosto de acuerdo con la invención.

5 Asimismo, la invención proporciona un jarabe de mosto de cerveza concentrado cuando se produce por un tal procedimiento.

Como enzima de licuación del almidón se prefiere utilizar α -amilasa bacteriana comercial que puede derivarse, por ejemplo, de las siguientes fuentes:

10

Bacillus subtilis

Bacillus megaterium

Bacillus cereus

Bacillus amyloliquefaciens

Bacillus polymyxa

15

Alternativamente, por ejemplo, el enzima de licuación del almidón puede ser proporcionado por el mosto de cerveza.

Preferiblemente, el tratamiento con enzima proteolítico se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 60°C y 75°C.

20

Cuando la licuación del almidón se lleva a cabo con anterioridad a la conversión de las proteínas, dicha temperatura de proteólisis está comprendida preferiblemente entre 60°C y 70°C, siendo más preferiblemente de 62°C aproximadamente; y preferiblemente, el pH está comprendido entre 5 y 6, siendo más preferiblemente de alrededor de 5,5.

25

30

La invención proporciona también un método para la producción de mosto de cerveza a partir de una papilla acuosa que contiene cebada no malteada, que comprende las etapas de licuar el almidón por tratamiento de la papilla



con α -amilasa, y tratar luego la papilla a una temperatura comprendida entre 60°C y 70°C con un enzima proteolítico comercial térmicamente estable derivado de Bacillus thermoproteolyticus Rokko.

5 Cuando la papilla se trata simultáneamente con el enzima de licuación del almidón y el enzima proteolítico, esto se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura comprendida entre 63°C y 75°C, por ejemplo entre 65°C y 70°C, más preferiblemente a 65°C aproximadamente, 10 y el pH está comprendido preferiblemente entre 5,5 y 8,5, por ejemplo entre 6,5 y 8,5, más preferiblemente de 7,5 aproximadamente.

La invención proporciona también un método para la producción de mosto de cerveza a partir de una papilla 15 acuosa que contiene cebada no malteada, en el cual se licúa el almidón y a la misma temperatura se convierten las proteínas en compuestos solubles que contienen nitrógeno por tratamiento simultáneo de la papilla a una temperatura comprendida entre 65°C y 70°C, con α -ami- 20 lasa y un enzima proteolítico comercial térmicamente estable derivado de

Bacillus thermoproteolyticus Rokko.

Se ha encontrado, por ejemplo, que si una mezcla molida típica de cereal crudo o cereal crudo y malta 25 requiere normalmente 0,5% de enzima proteolítico convencional y 0,5% de α -amilasa, ambos de actividad normal, sería necesario un período de 4 horas a 55°C seguido por un período de 4 horas a 65-70°C para licuar el almidón y solubilizar las proteínas; por un método que incorpo- 30 ra la invención utilizando simultáneamente un enzima pro-

400384



18

teolítico térmicamente estable y α -amilasa a los mismos niveles de actividad, se encuentra que únicamente son necesarias 4 horas de digestión a 65-70°C para alcanzar los mismos resultados.

5 En un método que incorpora la invención a modo de ejemplo, se muele en seco o en húmedo grano crudo o una mezcla de grano crudo más malta, y se empasta con agua a una temperatura inferior a aproximadamente 55°C para preparar una pasta uniforme y no gelatinizada y la temperatura se eleva después a 65°C. Se añaden luego α -amilasa comercial y proteinasa térmicamente estable comercial, y se deja que transcurra la digestión hasta que se ha producido una licuación apropiada del almidón y una conversión apropiada de las proteínas en compuestos solubles que contienen nitrógeno. Si es necesario, se eleva después la temperatura hasta un valor comprendido entre 70°C y 75°C para completar la licuación del almidón y la solubilización de las proteínas. Si el contenido de azúcares fermentables no es ahora suficiente, se reduce la temperatura hasta un valor comprendido entre 60°C y 65°C y se añade un enzima sacarificador capaz de liberar azúcares fermentables a partir de las dextrinas, dejando que tenga lugar la digestión.

10

15

20

25 El enzima sacarificador puede ser un enzima comercial o puede ser por ejemplo β -amilasa añadida en forma de malta molida. La β -amilasa comercial puede obtenerse por ejemplo a partir de soja. Pueden utilizarse otros enzimas sacarificadores, por ejemplo amiloglucosidasa.

30 Preferiblemente, el enzima sacarificador se utiliza a una temperatura comprendida entre 55°C y 60°C, y a un pH comprendido entre 4,5 y 6; pero en los casos en que



se utiliza amiloglucosidasa, puede ser conveniente operar fuera de este campo de pH.

5 A continuación del tratamiento con enzima, el mosto resultante se filtra y/o centrífuga, por ejemplo, y se hace pasar directamente a las etapas subsiguientes normales del procedimiento de producción de la cerveza. Alternativamente, por ejemplo, se filtra el mosto y se evapora para dar un jarabe que se almacena y se diluye posteriormente para proporcionar un mosto para las etapas subsiguientes normales del procedimiento; preferiblemente, el
10 mosto se filtra sin enfriarlo.

En otro método que incorpora la invención a modo de ejemplo, la mezcla molida inicial comprende una mezcla de grano no malteado y malta. La malta se pulveriza primeramente con una preparación acuosa de la α -amilasa y proteínasa, y la preparación de malta/enzima resultante se añade al cereal crudo o cocido a una temperatura comprendida entre 60 y 70°C, y preferentemente a 65°C; se observará que el límite inferior de temperatura preferido de
15 60°C es más bajo que en el caso de cereales no malteados, donde el límite inferior de temperatura preferido es de 63°C. El método se continúa después como se ha descrito anteriormente en esta memoria.

En un método adicional que incorpora la invención, se añade el enzima proteolítico a una malta normal de cervecería o a una masa braceada de malta/cereal no
25 malteado y el mosto se produce por lo demás de una manera convencional sin empleo de enzimas comerciales. Debido a que el enzima proteolítico es relativamente estable en todo el intervalo de temperatura admitido para el braceado (en-
30

400384

18



5 tre 55 y 75°C, con un óptimo de 65°C), las proteínas de
la malta se solubilizan adicionalmente por la acción del
enzima proteolítico. Inesperadamente, las proteínas de la
malta adicionales que se han solubilizado tienen la com-
10 posición de equilibrio normal de fracciones de peso mo-
lecular alto y bajo que puede esperarse en el mosto, y
por tanto, se aumenta la proporción de proteínas a hidra-
tos de carbono en el mosto. Por consiguiente, para resta-
blecer el equilibrio de proteínas a hidratos de carbono
15 en el valor que es más deseable para el procedimiento de
fabricación de cerveza de que se trata, la masa braceada
se puede enriquecer con cereal adicional no malteado de
tal modo que se emplee una proporción mayor que la usual
de material de hidratos de carbono no malteados. Adicional-
20 mente, en los casos en que han de utilizarse en la fabri-
cación de cerveza maltas que tienen un contenido bajo en
proteínas solubles disponibles, por ejemplo cuando se uti-
liza cebada de baja calidad para fines de malteado, la adi-
ción de una proteinasa térmicamente estable en el bracea-
do da como resultado la solubilización de proteínas adi-
cionales, elevando así el valor de equilibrio de proteínas
a hidratos de carbono hasta el nivel deseado.

25 En los Ejemplos que siguen, se utilizan ciertas
unidades para expresar la actividad enzimática. Estas uni-
dades se definen como sigue:

1. Unidades Xn

30 Se considera que una preparación de proteinasa
tiene una actividad de 36 unidades Xn por gramo cuando 5 ml
de una concentración de 2 gramos/litro de enzima actuando
sobre 10 ml de una solución acuosa al 2% en peso de caseína

"Hammerstein" a un pH de 6,5 tamponado con fosfato y a una temperatura de 35°C producen un total de 4 mg de nitrógeno soluble en una solución de ácido tricloroacético al 4% en 30 minutos.

2. Unidades X

Una preparación de α -amilasa bacteriana tiene una actividad de 1 unidad X por gramo cuando 250 mg de dicha preparación reaccionan con 1 gramo de peso en seco de almidón Farina en un volumen total de 55 ml a 30°C y a un pH de 6,0 (tampon de fosfato) de tal modo que se alcanza la dextrinización en 15 minutos.

La "dextrinización" se define como el momento en que el color obtenido por adición de 1 ml de la solución de reacción arriba indicada a 5 ml de solución de yodo 0,0007 N es igual a un color patrón. Este color puede controlarse visualmente por comparación con un disco de colorímetro "Lovibond" Núm. 4/29, patrón A.S.B.C. para amilasa en malta o, más preferiblemente, se puede leer en un espectrofotómetro con cubetas de vidrio de 1 cm a una longitud de onda de 6175 Å por comparación con agua destilada, cuando la densidad óptica es de 0,800.

3. Unidades Tyn

Una unidad Tyn es la cantidad de actividad de enzima que, cuando se hace reaccionar sobre 200 mg de caseína Hammerstein en un volumen total de 15 ml tamponado con fosfato a pH de 6,5 y a una temperatura de 35°C, produce en un período de reacción de 30 minutos 1 microgramo por minuto de equivalente de Tirosina de nitrógeno total soluble en solución de ácido tricloroacético al 4%.

1 K Tyn = 1000 Tyn, y 1 Xn = 5860 Tyn

400384

18 MAR 1952



4. Unidades Tys

Una unidad Tys es la cantidad de actividad de enzima que, cuando se hace reaccionar sobre 200 mg de caseína Hammerstein en un volumen total de 15 ml taponado con fosfato a pH de 6,5 y a una temperatura de 35°C, produce en un período de reacción de 30 minutos 1 microgramo por minuto de equivalente de Tirosina de compuestos aromáticos que contienen nitrógeno solubles en solución de ácido tricloroacético, tal como se determina midiendo la densidad óptica en cubetas de sílice de 1 cm por comparación con una prueba en blanco de reactivos a una longitud de onda de 2750 Å.

1 K Tys = 1000 Tys

EJEMPLO I

Comparación de una Digestión de Cebada al 100% utilizando una Proteinasa.

Bacteriana Convencional y una Proteinasa Bacteriana Térmicamente Estable

Experimento A - Proteinasa Bacteriana Normal

A una papilla acuosa de cebada molida se añadió 0,5% de Proteinasa 36Xn (36 unidades Xn/g - vendida por A.B.M. Industrial Products Limited), más 0,5% de Nervanasa (-amilasa de 9 unidades X/g - vendida por A.B.M Industrial Products Limited), referidos ambos pesos de enzima al peso original de cebada tal como se encontraba. La digestión se mantuvo a 55°C durante 4 horas (período proteolítico) y a 65°C durante 4 horas (período amilolítico). El mosto resultante se filtró y arrojó el siguiente análisis después de ser ajustado a una densidad de 1,040.



Rendimiento de Extracto	73,6%
Dilución Aparente del Mosto	78,1%
Nitrógeno Total del Mosto	82,6 mg/100 ml
Nitrógeno de α -amino del Mosto	19,4 mg/100 ml
Producto de tiempos de actividad de Proteinasa =	

$$\frac{0,5}{100} \times 36 \times 8 = 1,44$$

Experimento B - Proteinasa T

A una papilla acuosa de cebada molida a 65°C se añadió 0,5% de Proteinasa T (36 unidades Xn/g), más 0,5% de Nervanasa (α -amilasa, 9 unidades X/g), estando referidos ambos pesos de enzima al peso original de cebada. La digestión mantuvo a 65°C durante 4 horas y se filtró el mosto resultante. Después de ajustar el mosto a una densidad de 1,040, el análisis fué como sigue:

Rendimiento de Extracto	73%
Dilución Aparente del Mosto	79,0%
Nitrógeno Total del Mosto	88,7 mg/100 ml
Nitrógeno de α -amino del Mosto	20,1 mg/100 ml
Producto de tiempos de actividad de Proteinasa =	
$\frac{0,5}{100} \times 36 \times 4 = 0,72$	

Si se comparan los resultados de los Experimentos A y B, se puede ver que los mostos se asemejan estrechamente uno al otro. Sin embargo, el producto de tiempos de actividad de proteinasa en el Experimento B es aproximadamente la mitad que el encontrado para el Experimento A. Por consiguiente, se observa que cuando se utiliza la proteinasa térmicamente estable, o bien se puede duplicar la utilización de la planta, o bien se puede reducir a la

400384

18 MAR



mitad la actividad de proteinasa en comparación con el procedimiento en que se adopta una proteinasa normal. Análogamente, el producto de tiempos de actividad de α -amilasa para el Experimento B es la mitad que para el Experimento A.

EJEMPLO II

Uso de Proteinasa Térmicamente Estable para aumentar el contenido de Nitrógeno del Mosto.

Se preparón un mosto de malta braceando 1 parte en peso, de malta molida con 7 partes en peso, de agua a una temperatura de 65°C durante 2 horas. Se recogió el mosto por filtración. A fines de comparación, se preparó una masa braceada similar, pero se añadió 0,5% de Proteinasa T (36 unidades Xn/g) con respecto al peso de malta al comienzo del braceado. Se analizaron los mostos de ambos procedimientos, encontrándose los resultados siguientes:

	Masa Braceada Normal (Testigo)	Masa Braceada + Proteinasa T
Rendimiento %	78,5	79,1
Dilución aparente %	81,9	82,3
Nitrógeno Total, mg/100 ml	78,4	90,1
Fracción de Lundin A %	24,6	25,1
Fracción Lundin B %	10,2	10,8
Fracción Lundin C %	65,4	64,1
Nitrógeno de α -amino mg/100ml	20,1	23,6

De estos resultados, se puede deducir que la adición de Proteinasa T a la masa braceada ha aumentado el grado de solubilización del nitrógeno en tanto que se mantiene el espectro



de nitrógeno total del mosto. Se observará que la dilución aparente es menor en la muestra testigo.

EJEMPLO III

Digestión de Cebada al 100% utilizando Bioprasa

A una papilla acuosa de cebada molida a 65°C se añadió 0,188% de Bioprasa FN10 (100 unidades Xn/g) más 0,5% de Nervanasa (α -amilasa, 9 unidades X/g), referidos ambos pesos de enzima al peso original de cebada. La digestión se mantuvo a 65°C durante 4 horas y se filtró el mosto resultante. Se ajustó el mosto a una densidad de 1,040 y se analizó, obteniéndose los siguientes resultados:

Rendimiento de Extracto	74,0%
Dilución Aparente del Mosto	77,8%
Nitrógeno Total del Mosto	80,2 mg/100 ml
Nitrógeno de α -amino del Mosto	17,4 mg/100 ml
Producto de tiempos de actividad de Proteinasa = $\frac{0,188}{100} \times 100 \times 4 = 0,75$	

EJEMPLO IV

Digestión de Cebada al 100% utilizando D66/72

A una papilla acuosa de cebada molida a 65°C se añadió 0,25% de D66/72 (72 unidades Xn/g) más 0,5% de Nervanasa (α -amilasa, 9 unidades X/g), estando referidos ambos pesos de enzima al peso original de cebada. La digestión se mantuvo a 65°C durante 4 horas y se filtró el mosto resultante. Se ajustó el mosto a una densidad de 1,040

400384

18 MAR 1958



y se analizó, encontrándose los resultados siguientes:

5

Rendimiento de Extracto 72,8%

Dilución Aparente del Mosto 77,9%

Nitrógeno Total del Mosto 78,4 mg/100 ml

Nitrógeno de α -amino del Mosto 14,9 mg/100 ml

Producto de Tiempos de actividad de Proteinasa = $\frac{0,25}{100} \times 72 \times 4 = 0,72$

10

EJEMPLO V

Esquema de Fermentación de los Mostos Preparados con Proteinasa Térmicamente Estable

15

Se prepararon un mosto testigo y un mosto de proteinasa estable al calor por el procedimiento reseñado en el Ejemplo II. Se tomó una parte alícuota de 22 ml de cada mosto y se añadieron 0,15 g de levadura prensada. Se registró el grado de fermentación, medido por la disminución de la densidad relativa:

20

0 horas 12 horas 24 horas 36 horas 48 horas

25

Mosto Normal (Testigo)	1,040	1,035	1,021	1,009	1,007
Mosto de Proteinasa estable al calor	1,040	1,032	1,014	1,006	1,006

30

De estos resultados, se deduce que el mosto preparado por el uso de la proteinasa estable al calor fermentaba



a mayor velocidad y en mayor proporción que el mosto tes-
tigo.

EJEMPLO VI

5 Utilización de Enzima Proteolítico Térmicamente Estable pa-
ra Digerir una mezcla Molida de Cebada y Malta

Experimento A - Proteinasa Convencional

10 A una papilla acuosa de 50% de cebada molida y
50% de malta molida se añadió 1,0% de Proteinasa 36Xn (36
unidades Xn/g) más 1,0% de Nervanasa (α -amilasa, 9 unida-
des X/g), estando referidos ambos enzimas al peso de ce-
bada. La digestión se mantuvo a 65°C durante 2 horas, y el
15 mosto resultante se filtró y se ajustó a una densidad de
1,040. El análisis del mosto fué como sigue:

20	Rendimiento de Extracto	76,9%
	Dilución Aparente del Mosto	81,7%
	Nitrógeno Total del Mosto	70,6 mg/100 ml
	Nitrógeno de α -amino del Mosto	13,7 mg/100 ml

Experimento B - Proteinasa Térmicamente Estable

25 A una papilla acuosa de 50% de cebada molida y
50% de malta molida se añadió 1,0% de Proteinasa T 36 (36
unidades Xn/g) más 1,0% de Nervanasa (α -amilasa, 9 unida-
des X/g), estando referidos ambos enzimas al peso de cebada.
La digestión se mantuvo a 65°C durante 2 horas, y el mosto
30 resultante se filtró y se ajustó a una densidad de 1,040.

400384

18 M



El análisis del mosto fue como sigue:

Rendimiento de Extracto	77,3%
Dilución Aparente del Mosto	82,9%
Nitrógeno Total del Mosto	81,6 mg/100 ml
Nitrógeno de α -amino del Mosto	20,4 mg/100 ml

La sustitución del enzima de proteinasa normal por un equivalente en actividad de enzima proteolítico térmicamente estable ha dado como resultado una descomposición más completa de las proteínas contenidas en la mezcla molida.

Ejemplo VII

Comparación entre una Digestión Molida en Húmedo de 95% de Cebada y 5% de Malta Utilizando una Proteinasa Convencional y una Proteinasa Térmicamente Estable.

Experimento A - Proteinasa Bacteriana Convencional

La cebada se molió en húmedo y se empastó con agua a una temperatura de 53°C. Se añadieron una α -amilasa (Nervanasa 10X) y un enzima proteolítico (Proteinasa 36Xn), cada uno de ellos a una concentración de 1% en peso con respecto al peso de cebada. La masa braceada se mantuvo a 53°C durante 30 minutos (período proteolítico) y luego se elevó la temperatura a 72°C, manteniéndose esta temperatura durante 40 minutos (período amilolítico). Se enfrió la masa braceada a 62°C y se añadió 5% de malta molida. Después de 1 hora se elevó la temperatura a 75°C, se mantuvo esta temperatura durante 15 minutos, y se recuperó el mosto por filtración. El tiempo total de tratamiento, en el que



los enzimas se hicieron reaccionar con el grano, incluyendo el tiempo requerido para que se alcanzasen las diversas temperaturas, fué de 175 minutos. El análisis del mosto fué como sigue:

	Rendimiento de Extracto	73,4%
	Dilución Aparente del Mosto	73,8%
5	Nitrógeno Total	113,6 mg/100 ml
	Nitrógeno de α -amino	19,9 mg/100 ml
	Producto de tiempos de actividad de Proteinasa = $\frac{1,0}{100} \times 36 \times \frac{175}{60} = 1,05$	

10 Experimento B - Proteinasa Térmicamente Estable

La cebada se molió en húmedo y se empastó con agua. Se añadió una α -amilasa (Nervanasa 10X) a una concentración de 1,0% (con respecto al peso de cebada) y se agregó una proteinasa estable al calor (Proteinasa T 36) a una concentración de 0,5% (con respecto al peso de cebada). La temperatura se elevó rápidamente a 65°C y se mantuvo esta temperatura durante 60 minutos. La temperatura de la masa braceada se elevó después a 72°C, se mantuvo durante 10 minutos y se enfrió luego a 62°C. Se añadió la malta molida y, después de 1 hora, se elevó la temperatura a 75°C. Se recogió luego el mosto por filtración. El tiempo total de tratamiento fué de nuevo 175 minutos. El análisis del mosto fué como sigue:

	Rendimiento de Extracto	74,7%
	Dilución Aparente del Mosto	72,9%
15	Nitrógeno Total	168 mg/100 ml
	Nitrógeno de α -amino	23,9 mg/100 ml
	Producto de tiempos de actividad de Proteinasa = $\frac{0,5}{100} \times \frac{36}{1} \times \frac{175}{60} = 0,525$	

400384

18 MAR



Una comparación de los Experimentos A y B indica que el producto de tiempos de actividad de proteínasa se reduce y la digestión de las proteínas se mejora por el empleo del enzima térmicamente estable.

EJEMPLO VIII

Comparación de Cervezas Típicas Producidas a partir de Mostos Preparados Utilizando una Proteínasa Convencional y una Proteínasa Térmicamente Estable

Se prepararon 60 litros de mosto utilizando los procedimientos detallados en el Ejemplo I, Experimentos A y B, y cada uno de los mostos se hirvió con lúpulo para dar un valor de amargor de 40 partes por millón de isohumulona. Se enfriaron los mostos a 16°C y se añadió a cada uno de ellos levadura prensada en una proporción de 3,5 g/litro. Se dejaron fermentar las mezclas de Cerveza durante un tiempo total de 5 días y se separó por filtración la cerveza de la levadura, analizándose seguidamente.

Análisis de la Cerveza

	Proteínasa <u>Normal</u>	Proteínasa Es- <u>table al Calor</u>
25 Densidad original	1,040	1,040
Densidad Final	1,007	1,006
Nitrógeno total, mg/100 ml	46,8	53,9
Color, °E.B.C	11,0	12,5
pH	4,0	3,9
30 Estabilidad de la espuma ≤ segundos	110	108
Isohumulona, partes pormillón	28,5	28,0
Evaluación del sabor	6	8



Se apreciarán una vez más las cifras de densidad final.

Inesperadamente, el sabor de la cerveza resultante de la utilización de la proteinasa estable al calor fué apreciablemente mejor que el de la cerveza elaborada por el procedimiento normal. La diferencia era notable en el sentido de que el post-amargor astringente, frecuentemente apreciable en el caso de las cervezas elaboradas con una proteinasa normal, estaba ausente.

EJEMPLO IX

Comparación de Enzimas Proteolíticos Térmicamente Estables con una Proteinasa Convencional para Degradar las Proteínas en Cereales Pregelificados

Se bracearon 4 muestras individuales de 50 g de cebada finamente molida con 150 ml de agua y 1% (con respecto al peso de cebada) de Nervanasa 10X (α -amilasa de licuación del almidón). La temperatura se elevó rápidamente a 70°C durante 1 hora, y fué seguida por un período de 1 hora a 80°C. La masa braceada a la que se añadió la proteinasa normal (Proteinasa 36Xn), se enfrió a 55°C, y las otras masas braceadas a las que se añadieron los enzimas térmicamente estables, se enfriaron a 62°C. En todas las masas braceadas, se añadió una concentración de enzima proteolítico equivalente a 1% de Proteinasa 36Xn (con respecto al peso de cebada). Se dejó que transcurriesen los procesos de digestión durante 6 horas y se tomó muestra de todas y cada una de las digestiones para la determinación del contenido de nitrógeno soluble total y de nitrógeno de α -amino. Los resultados se tabulan a continuación.

400384 18



Tabla Indicativa del Grado de Solubilización de las Proteínas en Cebada Gelificada Utilizando Diversos Enzimas Proteolíticos.

Enzima	6 Horas	
	*N ₂ Soluble Total	*N de α -amino
Proteinasa 36Xn	47	7,9
Bioprasa PN10	58	10,7
A.B.M.I.P. D66/72	51	8,8
Proteinasa T36	55	11,9

*Valores expresados en mg de N₂/100 ml de digestión.

Estos resultados demuestran la solubilización mejorada de las proteínas cuando se utilizan los enzimas térmicamente estables, con indiferencia del hecho de que todos los enzimas se utilizaron a niveles equivalentes de actividad y en condiciones óptimas de pH y temperatura. Asimismo, se apreciará el comportamiento superior de la Proteínasa T en comparación con los otros enzimas térmicamente estables.

Además de ello, cuando se utilizó un enzima térmicamente estable y se efectuó la digestión a una temperatura superior, el sistema fué más estable biológicamente. Por ejemplo, después de 6 horas de digestión a 55°C, el pH de la mezcla de reacción había descendido desde 5,8 a 4,9, en tanto que a 62°C el pH se había reducido únicamente desde 5,8 a 5,6.

400384



EJEMPLO X

Caracterización de la Proteinasa T (Termoasa o Termolisi-
na de Daiwa Kasei)

Descripción

5 La Proteinasa T es un enzima proteolítico deriva-
do del Bacillus thermoproteolyticus Rokko que tiene una
estabilidad al calor y especificidad de sustrato excelen-
tes.

Propiedades Enzimáticas

- 10 (a) Peso molecular: 37.500 (aproximadamente)
- (b) pH óptimo - Tys normales a 35°C
pH : 5,5 6,5 8,5 10,2
K Tys : 10,0 20,0 21,2 4,8
- (c) Temperatura óptima - Tys normales a pH de 6,5:

15

	<u>K Tys</u>
25°C	10,0
35°C	20,0
55°C	48,9
60°C	60,2
70°C	81,2
80°C	66,0

- 20 (d) Estabilidad a la temperatura - Solución de enzima ca-
lentada a pH 5,5 durante 30 minutos antes de ensayar-
la a pH 6,5, 35°C:

25

<u>Temperatura de Calentamiento</u>	<u>Actividad Residual</u>
55°C	100%
60°C	100%
65°C	100%
70°C	98%
75°C	94%
80°C	49%
85°C	nula

30

(e) Proporción $\frac{Tyn}{Tys} = 33$

400384



(f) Inhibidores: fosfato, A.E.D.T.

(g) Activador: calcio.

5 Para caracterización adicional, se puede hacer referencia a los siguientes documentos, cuya descripción se incorpora en esta memoria como referencia:

(a) Matsubara, H., Singer, A., Sasaki, R., y Jukes, T.H., Biochem. Biophys. Res. Commun., 21 242 (1965);

10 (b) Endo, S., J. Fermentation Tech., 40 346 (1962);

(c) Ohta, Y., Ogura, Y., y Wada, A., J. Biol. Chem., 241 5919 (1966);

(d) Biotechnology and Bioengineering, vol. 12, Núm. 2, 1970.

15 EJEMPLO XI

Caracterización de Astra STL

Descripción

Astra STL es un enzima proteolítico térmicamente estable derivado de Streptomyces griseus.

20 Propiedades Enzimáticas

(a) pH óptimo - Tys normales a 35°C

pH	5,5	6,5	8,5	10,0
----	-----	-----	-----	------

K Tys	9,0	20,0	35,0	28,6
-------	-----	------	------	------

(b) Temperatura óptima -Tys normales a pH de 6,5.

25

Temperatura

K Tys

25°C	9,5
------	-----

35°C	20,0
------	------

50°C	45,0
------	------

60°C	34,4
------	------

70°C	36,2
------	------

80°C	27,6
------	------

30

85°C	23,0
------	------

90°C	9,6
------	-----

400384

18 MAR 1974



(c) Proporción $T_{yn} = 30$
Tys

(d) Inhibidores: fosfato, A.E.D.T.

EJEMPLO XII

Caracterización de Astra 1048

Descripción

Astra 1048 es un enzima bacteriano proteolítico térmicamente estable.

Propiedades Enzimáticas

(a) pH óptimo - Tys normales a 35°C

pH	5,5	6,5	8,5	10,2
K Tys	10,0	20,0	35,8	23,6

(b) Temperatura óptima - Tys normales a pH de 6,5.

<u>Temperatura</u>	<u>K Tys</u>
25°C	9,0
35°C	20,0
45°C	43,8
50°C	56,2
55°C	64,6
65°C	113,6
70°C	115,0
75°C	126,0
80°C	55,0

(c) Estabilidad a la temperatura - Solución de enzima calentada a pH 5,5 durante 30 minutos antes de ensayarla a pH 6,5, 35°C

40038418



Temperatura de Calentamiento Actividad Residual

	55°C	64%
	60°C	45%
	65°C	38%
5	70°C	20%
	75°C	nula

(d) Proporción Tyn/Tys = 49,4

(e) Inhibidores: fosfato, A.E.D.T.

(f) Activador: calcio.

10

EJEMPLO XIII

Caracterización de Alcalasa, Bioprasa y D66/72

Descripción

Alcalasa y D66/72 son enzimas proteolíticos térmicamente estables derivados de Bacillus subtilis. La Bioprasa es un enzima proteolítico térmicamente estable derivado de Bacillus Licheniformis. Los restantes rasgos característicos de los tres enzimas son sustancialmente idénticos.

15

Propiedades Enzimáticas

20

(a) Peso molecular: 27.000 - 30.000

(b) pH óptimo - Tys normales a 35°C

pH : 5,5 6,5 8,5 10,2

K Tys : 7,0 20,0 31,8 44,0

25

(c) Temperatura óptima - Tys normales a pH de 6,5

<u>Temperatura</u>	<u>K Tys</u>
25°C	10,0
35°C	20,0
55°C	93,0
65°C	144,6
70°C	118,4

30

400384

18 MAR 1971



(d) Estabilidad a la temperatura - Solución de enzima calentada a pH de 5,5 durante 30 minutos antes de ensayarla a pH de 6,5, 35°C.

5	<u>Temperatura de calentamiento</u>	<u>Actividad Residual</u>
	55°C	92%
	60°C	77%
	65°C	74%
	70°C	26%

10 (e) Proporción Tyn/Tys = 58
(f) Activador: Calcio.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en Gran Bretaña el 4 de Marzo de 1971 bajo el número 6042/71 que se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

-REIVINDICACIONES-

20 Los puntos de Invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España por VEINTE años son los siguientes:

25 1.-Un método para la producción de mosto de cerveza a partir de una papilla acuosa de materia vegetal que contiene almidón y proteínas (por ejemplo, cebada), en el que se licua el almidón por tratamiento de la papilla con un enzima de licuación del almidón (por ejemplo α -amilasa bacteriana comercial) y las proteínas se convierten en compuestos solubles que contienen nitrógeno con un enzima proteolítico,
30 caracterizado por el tratamiento a una temperatura superior

400384



a aproximadamente 55°C (preferiblemente entre 60°C y 75°C)
con un enzima proteolítico comercial térmicamente estable.

2.- Un método de acuerdo con la reivindicación
1, caracterizado por el hecho de que el enzima proteolíti-
co se deriva de Bacillus thermoproteolyticus Rokko.

3.- Un método de acuerdo con la reivindicación
1, caracterizado por el hecho de que el enzima proteolíti-
co se deriva de Streptomyces griseus.

4.- Un método de acuerdo con la reivindicación
1, caracterizado por el hecho de que el enzima proteolíti-
co se deriva de Bacillus subtilis o Bacillus lichenifor-
mis.

5.- Un método de acuerdo con una cualquiera de
las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por el hecho de que
se licúa el almidón y las proteínas se convierten a la mis-
ma temperatura en compuestos solubles que contienen nitró-
geno por tratamiento simultáneo de la papilla con el enzi-
ma de licuación del almidón y el enzima proteolítico.

6.- Un método de acuerdo con una cualquiera de
las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por el hecho de que
la licuación del almidón se completa sustancialmente antes
de la conversación de las proteínas.

7.- Un método de acuerdo con una cualquiera de
las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por el hecho de que
el enzima de licuación del almidón es un enzima comercial,
por el hecho de que se emplea también malta y por el hecho
de que la malta se pulveriza con una preparación acuosa del
enzima comercial de licuación del almidón y el enzima proteo-
lítico.

8.- Un método de acuerdo con una cualquiera de

400384



las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por el hecho de que la papilla acuosa comprende una masa braceada normal de cervecería que contiene malta con la adición de dicho enzima proteolítico comercial, proporcionando la malta el enzima de licuación del almidón.

5

9.- Un método de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por el hecho de que la papilla acuosa se enriquece con cereal no malteado adicional.

10.- " UN METODO PARA LA PRODUCCION DE MOSTO DE CERVEZA".

10

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta treinta hojas escritas a máquina por una sola cara.

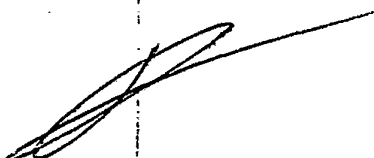
15

Madrid,

P.A.

18 MAR 1972
Alberto de Ezcurra
Por Poderes

20


13.2.1972 MJ/.