

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1 Titulo de la Invención(200 caracteres o espacios máximos)

UNA COMPOSICIÓN, PROCESO Y UN KIT PARA EL PROCESAMIENTO DEL AZÚCAR

2 Datos del Solicitante / Titular

Nombre:	RICHCORE LIFESCIENCES PVT. LTD.	Dirección Electrónica:	clientes@cavelier.com
Dirección:	Plot No. 204 & 237, Bommasandra - Jigani Link Road K.I.A.D.B Industrial Area Bangalore Rural District 560105 Karnataka, India	Domicilio/País de constitución:	INDIA - BANGLA - KARNATAKA
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☒ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE Número: 890905292-			

3 Solicitantes

Apellidos - Nombres o Razón Social	Tipo	Identificación
1. RICHCORE LIFESCIENCES PVT. LTD.	EE	890905292

4 Datos del Inventor

Nombre:	Subramani RAMACHANDRAPPA	Dirección Electrónica:	clientes@cavelier.com
Dirección:	Plot No. 204 & 237, Bommasandra - Jigani Link Road K.I.A.D.B Industrial Area Bangalore Rural District 560105 Karnataka, India	Domicilio/País de constitución:	INDIA - BANGLA - KARNATAKA
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT ☒ No Aplica Número: -			
5	Inventor(es)		
Apellidos - Nombres		Domicilio	
1. RAMACHANDRAPPA Subramani		INDIA	
2. SUCHARITA DASH Swati		INDIA	
6	Datos Inventor(es)		
País de Residencia	Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1. INDIA	BANGLA	KARNATAKA	Plot No. 204 & 237, Bommasandra - Jigani Link Road K.I.A.D.B Industrial Area Bangalore Rural District 560105 Karnataka, India

2.	INDIA	BANGLA	KARNATAKA	Plot No. 204 & 237, Bommasandra - Jigani Link Road K.I.A.D.B Industrial Area Bangalore Rural, District 560105 Karnataka, India	
7	Datos del Representante Legal / Apoderado				
Nombre:		JOSE ANDRES RINCON USCATEGUI	Dirección Electrónica:		cavelier@cavelier.com
Dirección:		CARRERA. 4 No. 72- 35	Domicilio/País de constitución:		COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE Número: 79780910-					
Presentación de Poder					
Año de Radicación					
Número de Radicación					
8	Datos Solicitud: PCT / WO				
Número Solicitud:		PCT/IB2014/061982	Fecha Solicitud:		05/06/2014
Número Publicacion:		WO 2014/195898 A1	Fecha Publicacion:		11/12/2014
9	Declaraciones de prioridad			☒ SI ☐ NO	
1.	(33) País de origen INDIA	Codigo del país IN	(31) No. Solicitud 2496/CHE/2013	(32) Fecha _ 06/06/2013	
10	Reivindicaciones				
Número reivindicaciones:		20	Pago Reivindicaciones:		No
11	Reducción de tasas.				
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.					

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

☐ Micro, pequeñas y medianas empresas

☐ Universidades públicas o privadas

☐ Entidades sin ánimo de lucro

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

12	Documentos Anexos
-----------	--------------------------

☒ Reivindicaciones

☒ Descripción

☒ Dibujos y/o Figuras

☒ Resumen

☐ Certificado Depósito Material Biológico

☐ Uso de Conocimiento tradicional

☐ Listado de secuencias

☐ Artes finales 12 x 12 cm

☐ Poderes, si fuere el caso

☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad

☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad

☐ Otros Anexos

"UNA COMPOSICIÓN, PROCESO Y UN KIT PARA EL PROCESAMIENTO DEL AZÚCAR"

CAMPO TÉCNICO

- 5 La presente descripción se refiere al campo de la biotecnología industrial. En particular, la presente descripción se refiere a un producto de sustitución de azufre con una base enzimática, un proceso de sustitución de azufre con una base enzimática y un kit que se puede utilizar en el procesamiento del azúcar. La presente descripción también se relaciona con una composición que comprende una mezcla de enzimas empleadas en el
- 10 proceso para la obtención de un producto para la sustitución del azufre; y un producto final obtenido después del procesamiento del azúcar.

ANTECEDENTE DE LA DESCRIPCIÓN

- El color del azúcar es un atributo comercial importante y la eliminación del color es un
- 15 paso importante en la fabricación del azúcar, considerando el aumento de la demanda de azúcar blanca de alta calidad.

- Una serie de procesos nuevos y tradicionales utilizando productos químicos están disponibles para lograr una buena extracción del color. Entre ellas destacan la
- 20 carbonatación, sulfitación, fosfatación, adsorción con carbón activado y técnicas más nuevas como lo es el uso de polímeros para la floculación y resinas de intercambio iónico. En la actualidad, la sulfitación es el método más común utilizado para la clarificación del jugo de caña.

- 25 La caña de azúcar contiene aproximadamente 70% de agua, en la que la sacarosa y otras sustancias permanecen en la solución, formando alrededor de 88% por peso del jugo en el tallo. El 12% restante representa el componente de fibra insoluble de la caña. El jugo de la caña de azúcar se compone de una solución de sacarosa que contiene impurezas solubles e insolubles (es decir, especies no sacarosas). El jugo de la caña de azúcar tiene
- 30 un pH ácido que oscila entre 4.9 a 5.5.

Los compuestos que imparten color al jugo de la caña de azúcar pueden dividirse en 6 categorías: pigmentos de plantas, precursores del color, melanoidinas, caramelos, productos de degradación alcalina de la fructosa (ADF, en inglés) y colorantes
5 polisacáridos complejos. Los cuatro últimos son pigmentos de color producidos en fábrica.

La turbidez en el jugo de la caña de azúcar se debe a la presencia de polisacáridos y material de fibra hemicelulósico. En la caña de azúcar, los polisacáridos comunes son
10 polisacáridos nativos de la caña de azúcar (ISP) y el almidón. Los polisacáridos disminuyen la filtrabilidad, aumentan el tiempo de ebullición y disminuyen la recuperación y pueden alterar la estructura cristalina de la sacarosa, resultando en cristales alargados o deformados, lo que conlleva problemas en el proceso de centrifugación, y en los productos del usuario final. El almidón se encuentra
15 principalmente en las hojas y los puntos de crecimiento de la planta de caña de azúcar, y se transfieren al jugo crudo cuando la caña de azúcar es triturada en el molino.

La sulfitación es la práctica de adicionar dióxido de azufre (SO_2) o sus derivados a los flujos del proceso en una fábrica de azúcar. Este es un paso importante en la fabricación
20 de la azúcar blanca, que se lleva a cabo principalmente por tres razones:

- a. Bloqueo del Color
- b. Control del pH
- c. Biocida

25 El método más utilizado de sulfitación en países tropicales es el método de sulfitación caliente. En este proceso, el jugo se calienta primero a 75°C , luego es sulfitado y encalado, hervido y reposado. El proceso Harloff es un procedimiento de tratamiento en caliente en el que el jugo se calienta a 75°C y la cal y el SO_2 se agregan simultáneamente de tal forma que se mantenga la reacción ácida a la fenolftaleína y
30 alcalina al tornasol (pH alrededor de 7.4-7.8), salvo hacia al final, cuando se añade una cantidad de cal hasta alcanzar una reacción alcalina fuerte (pH 10+), después de lo cual se

completa la sulfitación hasta la neutralidad a tornasol (pH 7.2). Como en todos los otros procesos similares, el jugo finalmente se lleva a temperaturas de ebullición en calentadores de jugo y luego se deja reposar. El jugo se centrifuga para retirar los lodos y se obtiene el sobrenadante transparente para su posterior procesamiento.

5

Sin embargo, las limitaciones de los procesos descritos anteriormente son tal como sigue:

- i. El azúcar producido por doble sulfitación contiene > 20 ppm de azufre que está más allá de los límites aceptables, por lo que la calidad se ve afectada.
- 10 ii. El azúcar producido por sulfitación no forma una solución clara cuando se disuelve debido a la presencia de sulfato de calcio y polisacáridos.
- iii. El SO₂ (di-óxido de azufre) no se disuelven completamente durante sulfitación y provoca daños ambientales.
- iv. El proceso da lugar a problemas de formación de cáscara en evaporadores debido a la deposición del sulfato de calcio.
- 15 v. En el producto obtenido por dicho proceso, hay formación de color secundario (color de retorno) luego del almacenamiento del producto.

La cristalización por sí sola es útil en la partición de los colorantes del azúcar, pero no es 100% eficaz y, por lo tanto, es complementado con otros métodos físicos y químicos de 20 separación/extracción del colorante. Cada proceso tiene sus propias ventajas, así como las limitaciones en términos de rendimiento (fosfatación), la inversión de capital (intercambio de iones y el uso de polímeros) y los efectos sobre el medio ambiente y la salud de los consumidores (sulfitación y uso de cal).

25 Aunque la sulfitación es el proceso más comúnmente utilizado que involucra el uso del gas SO₂ para lograr la eliminación de colorantes en la clarificación del jugo de la caña de azúcar, los incrementos periódicos en los precios del azufre y los problemas de la calidad del azúcar debido al exceso de azufre (> 10-20 ppm) precipitados en cristales de azúcar han estimulado los esfuerzos por reducir o incluso eliminar su uso y producir azúcar sin 30 'azufre'. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de un método rentable, compatible y amistoso con el medio ambiente como alternativa a la sulfitación.

La presente descripción emplea enzimas para sustituir o complementar las prácticas actuales de eliminación del color durante la fabricación del azúcar y por lo tanto es una alternativa atractiva para los métodos fisicoquímicos convencionales.

5

La presente descripción también proporciona un producto de sustitución del azufre con una base enzimática, una composición y un proceso para el procesamiento del azúcar que aborda las preocupaciones asociadas con los actuales métodos de procesamiento del azúcar.

10

DECLARACIÓN DE LA DESCRIPCIÓN

En consecuencia, la presente descripción se refiere a una composición que comprende una mezcla de enzimas, opcionalmente junto con un excipiente; un proceso para la clarificación del jugo de caña de azúcar, dicho proceso comprende: a) la mezcla del jugo con la mezcla de enzimas para obtener una mezcla, b) opcionalmente reteniendo la mezcla y luego dejarla enfriar, y c) neutralizando la mezcla del paso (a) o el paso (b) mediante la adición de un regulador de pH, seguido de la retención y opcional enfriamiento, seguido de la opcional adición de un excipiente o el filtrado o ambos, para obtener el jugo de azúcar clarificado obtenido por medio del proceso descrito anteriormente; un proceso para obtener una composición que comprenda una mezcla de enzimas opcionalmente junto con un excipiente, dicho proceso compuesto por el paso de combinar la pluralidad de las enzimas seleccionadas de un grupo compuesto por amilasa, xilanasa, celulasa, hemicelulasa, glucanasa, galactosidasa, glucosa oxidasa y ácido ascórbico sin componente enzimático o cualquier combinación de los mismos, opcionalmente, junto con el excipiente para obtener la mezcla de enzimas; y un kit para la clarificación del jugo de azúcar o para obtener el azúcar clarificado, dicho kit compuesto por enzimas seleccionadas del grupo compuesto por amilasa, xilanasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, glucanasa, galactosidasa, glucosa oxidasa y ácido ascórbico sin componente enzimático o cualquier combinación de los mismos, el regulador del pH seleccionado de un grupo formado por óxido de calcio (cal), hidróxido de calcio (lechada de cal), ácido ortofosfórico y compuestos de calcio inorgánicos o cualquier combinación

de los mismos y los excipientes seleccionados de un grupo compuesto por el agente anti aglutinante, estabilizador y floculante o cualquier combinación de los mismos, junto con un manual de instrucciones.

5 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES QUE SE ADJUNTAN**

Con el fin de que la descripción pueda ser fácilmente comprensible y puesta en práctica, a partir de ahora se hará referencia a las formas de realización ilustrativa con referencia a las ilustraciones que se adjuntan al texto. Las ilustraciones, junto con una descripción detallada a continuación, están incorporadas y forman parte de la especificación, y sirven para ilustrar de una mejor manera las formas de realización y explicar los diversos principios y ventajas, de conformidad con la presente descripción en donde:

La Figura 1 muestra un diagrama de flujo del proceso de fabricación de la caña de azúcar y los puntos de aplicación de las enzimas para sustituir el azufre.

10 **La Figura 2** muestra una gráfica de barras representando las unidades ICUMSA para evaluar la reducción del color en el jugo de caña de azúcar sin tratamiento, con sulfitación y en presencia de la mezcla de la enzima 'G' en la muestra 1.

La Figura 3 muestra una gráfica de barras que representa gráficamente la comparación del color en el jugo de caña de azúcar sin tratamiento, el jugo claro sulfitado y el jugo claro tratado con la mezcla de enzimas 'G' en la muestra 2.

15 **La Figura 4** muestra una gráfica de barras mostrando el aumento de la pureza del jugo claro tratado con la mezcla de enzimas 'G' en comparación con el proceso de sulfitación convencional.

La Figura 5 muestra una gráfica de barras mostrando el color final del azúcar obtenido por medio del proceso sulfitación (87 Unidades ICUMSA) y la aplicación de la mezcla de enzimas 'G' (91 unidades ICUMSA).

20 **La Figura 6** muestra una gráfica de barras que representa gráficamente el porcentaje de recuperación final del azúcar obtenida por medio del proceso de sulfitación (10.04%) y la aplicación de la mezcla de enzimas de la aplicación 'G' (10.38%).

La Figura 7 muestra el flujo del proceso para la fabricación del azúcar de la remolacha.

25 **La Figura 8** muestra el flujo del proceso para la fabricación de azúcar a partir del azúcar sin refinar.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DESCUBRIMIENTO

La presente descripción se refiere a una composición que comprende una mezcla de enzimas, opcionalmente junto con el excipiente.

5

En una forma de realización de la presente descripción, la composición es una composición sinérgica y en donde la mezcla de enzimas comprende la pluralidad de las enzimas seleccionadas de un grupo compuesto de amilasa, xilanasa, celulasa, hemicelulasa, glucanasa, galactosidasa, glucosa oxidasa y ácido ascórbico sin componente enzimático o cualquier combinación de los mismos.

10

En otra forma de realización de la presente descripción, la amilasa se selecciona de un grupo compuesto por la α -amilasa, β -amilasa y γ -amilasa o cualquier combinación de los mismos en una concentración que va desde aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 99% p/p, preferentemente de aproximadamente un 10% a un 20% p/p; la xilanasa se selecciona de un grupo compuesto por exo-xilanasa y endo-xilanasa o una combinación de estos, en una concentración que va desde aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 99% p/p, preferentemente de aproximadamente un 20% hasta aproximadamente 40% p/p; la celulasa es seleccionada de un grupo compuesto de exo-celulasa, endo-celulasa y glucosidasa o cualquier combinación de los mismos en una concentración que va desde aproximadamente 0.1% hasta alrededor del 99% p/p, preferentemente de aproximadamente un 20% hasta aproximadamente 40% p/p; la hemicelulasa está en una concentración que va desde aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 99% p/p, preferentemente de aproximadamente 15% hasta aproximadamente 30% p/p; la glucanasa es seleccionada de un grupo formado por α -glucanasa, β -glucanasa, Xiloglucano específico endo-1,4-beta-glucanasa, Xiloglucano específico exo-beta-1,4-glucanasa y pululanasa o cualquier combinación de los mismos en una concentración que va desde aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente el 99% p/p, preferentemente entre un 5% hasta aproximadamente 30% p/p; la galactosidasa es seleccionada de un grupo formado por α -galactosidasa y β -galactosidasa o una combinación de estos, en una concentración que va desde aproximadamente 0.1% hasta

15

20

25

30

alrededor del 99% p/p, preferentemente de alrededor del 5% al 10% p/p; la glucosa oxidasa se encuentra en una concentración que va desde aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 99% p/p, preferentemente de alrededor del 5% al 10% p/p; y el componente ácido ascórbico sin componente enzimático se encuentra en una
5 concentración que oscila entre el 0.1% hasta aproximadamente el 99% p/p, preferiblemente de entre 0.015 a 10 % p/p.

En otra forma de realización de la presente descripción, la composición se emplea para aclarar el jugo de azúcar o la obtención de azúcar sin sustancias químicas, y en donde el
10 jugo de azúcar se obtiene de una fuente seleccionada de un grupo compuesto por caña de azúcar, remolacha, azúcar sin refinar, y otro sustrato utilizado para el procesamiento de azúcar o cualquier combinación de los mismos.

En otra forma de realización de la presente descripción, el excipiente es seleccionado de
15 un grupo compuesto por el agente anti aglutinante, estabilizador y floculante o cualquier combinación de los mismos.

En otra forma de realización de la presente descripción, el agente antiaglutinante se selecciona de un grupo formado por la sílice pirógena, bentonita y talco o cualquier
20 combinación de los mismos; en donde el estabilizador es seleccionado de un grupo compuesto por cloruro de sodio, la sílice pirógena, sacarosa, maltodextrina, trehalosa, lactosa, arabinosa y celulosa o cualquier combinación de los mismos; y donde el floculante es un floculante aniónico.

25 En otra forma de realización de la presente descripción, el excipiente está en concentraciones que van desde 0.01% hasta aproximadamente un 20%, preferiblemente aproximadamente en 1% hasta aproximadamente 10%.

La presente descripción también se refiere a un proceso para clarificar el jugo de azúcar,
30 dicho proceso compuesto por los siguientes pasos:

- a. Mezclar el jugo con una mezcla de enzimas para obtener una mezcla;

- b. Opcionalmente retener la mezcla, seguido del enfriamiento de la mezcla; y
- c. Neutralizar la mezcla del paso (a) o el paso (b) mediante la adición de un regulador de pH, retener de nuevo y opcionalmente volver a enfriar, seguido de la adición opcional del excipiente o el filtrado o ambos, para obtener el jugo de azúcar clarificado.

5

En una de las formas de realización de la presente descripción, el jugo de azúcar se obtiene de una fuente seleccionada de un grupo compuesto por caña de azúcar, remolacha, azúcar sin refinar y otro sustrato utilizado para el procesamiento del azúcar o cualquier combinación de los mismos.

10

En otra forma de realización de la descripción, la mezcla de enzimas consta de la pluralidad de las enzimas seleccionadas de un grupo compuesto de amilasa, xilanas, celulasa, hemicelulasa, glucanasa, galactosidasa, glucosa oxidasa y ácido ascórbico o cualquier combinación de los mismos; y donde la amilasa es seleccionada de un grupo compuesto por la α -amilasa, β -amilasa y γ -amilasa o cualquier combinación de los mismos en una concentración que va desde aproximadamente 0.1% hasta alrededor del 99% p/p, preferentemente de entre aproximadamente un 10% hasta un 20% p/p; la xilanas se selecciona de un grupo compuesto por exo-xilanas y endo-xilanas o una combinación de éstos, en una concentración que va desde aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente el 99% p/p, preferentemente de aproximadamente un 20% hasta aproximadamente el 40% p/p; la celulasa se selecciona de un grupo compuesto de exo-celulasa, endo-celulasa y glucosidasa o cualquier combinación de los mismos en una concentración que va desde aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente el 99% p/p, preferentemente de aproximadamente un 20% hasta aproximadamente el 40% p/p; la hemicelulasa es en una concentración que va desde aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente el 99% p/p, preferentemente de aproximadamente 15% hasta aproximadamente el 30% p/p; la glucanasa se selecciona de un grupo formado por α -glucanasa, β -glucanasa, Xiloglucano específico endo-1,4-beta-glucanasa, Xiloglucano específico exo-beta-1,4-glucanasa y pululanasa o cualquier combinación de los mismos en una concentración que va desde aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente el

15

20

25

30

99% p/p, preferentemente de alrededor del 5% hasta aproximadamente el 30% p/p; la galactosidasa se selecciona de un grupo formado por α -galactosidasa y β -galactosidasa o una combinación de éstos, en una concentración que va desde aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente el 99% p/p, preferentemente de aproximadamente el 5% hasta
5 aproximadamente el 10% p/p; la glucosa oxidasa se encuentra en una concentración que van desde aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente el 99% p/p, preferentemente de alrededor del 5% al 10% p/p; y el ácido ascórbico sin componente enzimático se encuentra en una concentración que oscila entre aproximadamente el 0.1% hasta aproximadamente el 99% p/p, preferiblemente entre unos 0.015 hasta aproximadamente
10 el 10 % p/p.

En otra forma de realización de la descripción, la mezcla se realiza mediante la adición de la enzima a la mezcla del jugo de azúcar a una temperatura de 35°C hasta aproximadamente 45°C o en donde la mezcla se realiza mediante la adición de la enzima
15 a la mezcla del jugo de azúcar hasta obtener una mezcla, luego de hervir la mezcla a una temperatura de aproximadamente entre 65°C a 75°C.

En otra forma de realización de la descripción, el paso (b) de retención se realiza a una temperatura que oscila entre 50°C a 80°C durante un período de tiempo que va desde los
20 5 hasta los 15 minutos.

En otra forma de realización de la presente descripción, el enfriamiento se realiza a una temperatura que oscila entre 25°C a 30°C.

25 En otra forma de realización de la descripción, la neutralización se lleva a cabo mediante la adición del regulador de pH seleccionado de un grupo formado por óxido de calcio (cal), hidróxido de calcio (lechada de cal), ácido ortofosfórico y compuestos de calcio inorgánicos o cualquier combinación de los mismos.

30 En otra forma de realización de la descripción, el paso (c) de repetir la retención se realiza durante un período de tiempo que va desde 20 minutos hasta aproximadamente 90

minutos, a una temperatura que oscila entre 90°C hasta aproximadamente 110°C o es para un período de tiempo que va desde 10 minutos hasta aproximadamente 20 minutos, a una temperatura que oscila entre 90°C hasta aproximadamente 110°C.

- 5 En otra forma de realización de la presente descripción, el filtrado se realiza por el método seleccionado de un grupo formado por filtración por membrana, filtros de prensa y sedimentación o cualquier combinación de los mismos.

En otra forma de realización de la descripción, el jugo de azúcar clarificado puede ser
10 procesado para obtener azúcar clarificada.

En otra forma de realización de la presente descripción, el proceso comprende los siguientes pasos:

- a. Agregar la mezcla de enzimas al jugo de azúcar a una temperatura de entre 30°C a 45°C para obtener una mezcla.
- 15 b. Opcionalmente reteniendo a una temperatura que oscile entre 50°C a 80°C durante un período de tiempo que va desde 5 hasta aproximadamente 15 minutos seguido del enfriamiento de la mezcla a una temperatura que oscila entre 25°C a 30°C aproximadamente; y
- c. Neutralizar la mezcla del paso (a) o el paso (b) mediante la adición de un
20 regulador de pH, seguido de la retención nuevamente de la mezcla durante un período de tiempo que oscila entre 20 minutos hasta aproximadamente 90 minutos, a una temperatura que oscila entre 90°C hasta aproximadamente 110°C y opcionalmente enfriar de nuevo, seguido de la adición opcional de un excipiente o filtrado, o ambos, para obtener el jugo de azúcar clarificado.

25

En otra forma de realización de la presente descripción el proceso comprende los siguientes pasos:

- a. Agregar la mezcla de enzimas al jugo de azúcar hasta obtener una mezcla, luego hervir la mezcla a una temperatura de entre 65°C hasta 75°C;
- 30 b. Opcionalmente retener a una temperatura que oscila entre 50°C hasta 80°C durante un período de tiempo que va desde 5 minutos hasta aproximadamente

15 minutos seguido del enfriamiento de la mezcla a una temperatura que oscila entre 25°C hasta aproximadamente 30°C; y

- 5 c. Neutralizar la mezcla del paso (a) o el paso (b) mediante la adición de un regulador de pH, seguido de la retención nuevamente de la mezcla durante un período de tiempo que van desde 10 minutos hasta aproximadamente 20 minutos, a una temperatura que oscila entre aproximadamente 90°C hasta 110°C y opcionalmente volver a enfriar, seguido de la adición opcional de excipiente o filtrado o ambos, para obtener el jugo de azúcar clarificado.
- 10 La presente descripción también se refiere al jugo de azúcar clarificado obtenido por el proceso tal como se mencionó anteriormente.

En una las formas de realización de la presente descripción, el jugo puede ser procesado para obtener azúcar clarificada.

- 15 La presente descripción también se refiere a un proceso para obtener una composición que comprende una mezcla de enzimas opcionalmente junto con un excipiente, dicho proceso compuesto por el paso de combinar la pluralidad de las enzimas seleccionadas de un grupo compuesto de amilasa, xilanas, celulasa, hemicelulasa, glucanasa, b-galactosidasa, glucosa oxidasa y ácido ascórbico sin componente enzimático o cualquier combinación de los mismos, opcionalmente, junto con un excipiente para obtener la mezcla de enzimas.
- 20

- La presente descripción también se relaciona con un kit para la clarificación del jugo de azúcar o para obtener azúcar clarificada, dicho kit compuesto por enzimas seleccionadas del grupo compuesto de amilasa, xilanas, celulasa, hemicelulasa, glucanasa, b-galactosidasa, glucosa oxidasa y ácido ascórbico sin componente enzimático o cualquier combinación de los mismos; regulador de pH seleccionado de un grupo formado por óxido de calcio (cal), hidróxido de calcio (lechada de cal), ácido ortofosfórico y compuestos de calcio inorgánicos o cualquier combinación de los mismos; y el excipiente
- 25
- 30

seleccionado de un grupo compuesto por el agente anti aglutinante, estabilizador y floculante o cualquier combinación de los mismos, junto con un manual de instrucciones.

Debido a los inconvenientes de los procesos previamente conocidos y existentes en el arte
5 relativas al procesamiento del azúcar y considerando el requisito actual de un “proceso más ecológico” de fabricación del azúcar, en la presente descripción se ha diseñado un método enzimático para sustituir los productos químicos tales como el azufre en el procesamiento del azúcar.

10 El uso de enzimas sobre otras técnicas conocidas para el procesamiento del azúcar ofrece ventajas tales como la no exigencia de capital de inversión (en comparación con el uso de resinas de intercambio iónico en columna), la generación de baja cantidad de sedimento (en comparación con el uso de carbón activado y la carbonización) y relativamente más rentable (en comparación con el empleo de técnicas costosas utilizando resinas y
15 polímeros).

Las enzimas trabajan en los colorantes formados en el sustrato, preferentemente en el jugo de la caña de azúcar; se hidroliza la materia hemicelulósica o las fibras o polisacáridos en el sustrato y previene la oxidación de fenólicos. Así, en la presente
20 descripción se encuentra la aplicación en la producción de azúcar sin azufre y la clarificación del jugo de la caña de azúcar, remolacha o de azúcar refinada en la industria azucarera.

En consecuencia, la presente descripción se refiere a un producto de sustitución de azufre
25 con una base enzimática, una composición que comprende componentes para obtener el producto de sustitución de azufre con una base enzimática, un proceso de clarificación del jugo de azúcar y un proceso para la preparación del azúcar sin azufre- ambos para la obtención de un producto de sustitución del azufre con una base enzimática.

30 En una las formas de realización de la presente descripción, el sustrato utilizado en el procesamiento del azúcar se selecciona de un grupo compuesto por jugo de caña de

azúcar (de la caña de azúcar) y otros sustratos utilizados para el procesamiento del azúcar, incluyendo pero no limitando al jugo de remolacha (del azúcar de la remolacha), azúcar sin refinar, etc., y la combinación de los mismos.

- 5 En otra forma de realización de la descripción, la enzima se selecciona de un grupo compuesto por la xilanasa (exo-xilanasa, endo-xilanasa), celulasa (exo-celulasa, endo-celulasa, glucosidasa), hemicelulasa, glucanasa (α -glucanasa, β -glucanasa, xiloglucano específico endo-1,4-beta-glucanasa, Xiloglucano específico exo-beta-1,4-glucanasa, pululanasa), b-galactosidasa (α -galactosidasa, β -galactosidasa), glucosa oxidasa, amilasa
 10 (α -amilasa β -amilasa, γ -amilasa) y ácido ascórbico o la mayoría relativa a cualquier combinación de los mismos.

- En otra forma de realización de la presente descripción, cada una de las enzimas se encuentra en concentraciones que van desde aproximadamente 0.1% hasta
 15 aproximadamente 99%; preferiblemente que van desde aproximadamente 5% hasta aproximadamente 99%, de 10% hasta aproximadamente 99%, de 5% hasta aproximadamente 80%, de 10% hasta aproximadamente 80% de 5% hasta aproximadamente 60%, de 10% hasta aproximadamente 60%, de 5% hasta aproximadamente 50%, de 10% hasta aproximadamente 50%, de 5% hasta
 20 aproximadamente 40%, de 10% hasta aproximadamente 40%, de 5% hasta aproximadamente 20%, o de 10% hasta aproximadamente 20%, o de preferencia de 5%, hasta aproximadamente 10%, hasta aproximadamente 15%, hasta aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente el 30%, hasta aproximadamente el 35%, hasta aproximadamente 40%, hasta aproximadamente 45%, hasta aproximadamente 50%, hasta
 25 aproximadamente 55%, hasta aproximadamente 60%, hasta aproximadamente 65%, hasta aproximadamente 70%, hasta aproximadamente 75%, hasta aproximadamente 80%, hasta aproximadamente 85%, hasta aproximadamente 90%, hasta aproximadamente 95% o 99%.

- 30 En otra forma de realización de la presente descripción, la amilasa es seleccionada de un grupo compuesto por la α -amilasa, β -amilasa y γ -amilasa o cualquier combinación de los

- mismos en una concentración que va desde aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 99% p/p, preferentemente de entre aproximadamente 5% a 50% p/p y preferentemente si es de entre aproximadamente 10% a 20% p/p; la xilanasas se selecciona de un grupo compuesto por exo-xilanasas y endo-xilanasas o una combinación de éstos, en una concentración que va desde aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 99% p/p, preferentemente entre aproximadamente 10% hasta aproximadamente el 50% p/p y más preferentemente si es entre 20% hasta aproximadamente el 40% p/p; la celulasa se selecciona de un grupo compuesto de exo-celulasa, endo-celulasa y glucosidasa o cualquier combinación de los mismos en una concentración que va desde aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 99% p/p, preferentemente si es entre 10% hasta aproximadamente 50% p/p y mejor si es entre 20% hasta aproximadamente el 40% p/p; la hemicelulasa es en una concentración que van desde aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 99% p/p, preferentemente si es entre 5% hasta aproximadamente el 50% p/p y mejor si es entre 15% hasta aproximadamente el 30% p/p; la glucanasa se selecciona de un grupo formado por α -glucanasa, β -glucanasa, Xiloglucano específico endo-1,4-beta-glucanasa, Xiloglucano específico exo-beta-1,4-glucanasa y pululanasa o cualquier combinación de los mismos en una concentración que va desde aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 99% p/p, preferentemente si es entre 2% hasta aproximadamente 50% p/p y mejor si es entre 5% hasta aproximadamente 30% p/p; la galactosidasa se selecciona de un grupo formado por α -galactosidasa y β -galactosidasa o una combinación de éstos, en una concentración que va desde aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 99% p/p, mejor si es entre 2% hasta aproximadamente 50% p/p y mejor si es entre 5% hasta 10% p/p; la glucosa oxidasa se encuentra en una concentración que va desde 0.1% hasta aproximadamente 99% p/p, preferentemente si es entre 2% hasta aproximadamente 50% p/p y mejor si es entre 5% hasta aproximadamente 10% p/p; y el ácido ascórbico se encuentra en una concentración que oscila entre el 0.1% hasta aproximadamente 99% p/p, de preferencia que sea entre 2% hasta aproximadamente 50% p/p y mejor si es entre 0.015 hasta aproximadamente 10 % p/p.
- En otra forma de realización de la presente descripción, las enzimas se combinan para obtener una mezcla de enzimas/sistema enzimático, que se emplea en el proceso de

procesamiento del azúcar (proceso sin azufre/proceso de reemplazo del azufre a base en enzimas) de la presente descripción.

En otra forma de realización de la descripción, la mezcla de enzimas comprende la
5 combinación de enzimas seleccionadas de un grupo compuesto de xilanasas y celulasas;
xilanasas, celulasas y hemicelulasas; xilanasas, celulasas, hemicelulasas y glucanasas; xilanasas,
celulasas, hemicelulasas, amilasas y glucanasas; xilanasas, celulasas, hemicelulasas, amilasas,
glucanasas, galactosidasas y glucosa oxidasa; y xilanasas, celulasas, hemicelulasas, amilasas,
glucanasas, galactosidasas, glucosa oxidasa y ácido ascórbico, opcionalmente junto con
10 excipientes.

En otra forma de realización de la descripción, la dosificación de la mezcla de enzimas
empleada está en el rango de entre 1.000ppm hasta aproximadamente 50ppm,
preferiblemente entre 2ppm a 30 ppm, aproximadamente, dependiendo de la naturaleza
15 de los colorantes y la materia contribuirán a la turbidez en el jugo.

En otra forma de realización de la presente descripción, el proceso de obtención de azúcar
sin azufre o la clarificación del jugo de azúcar se lleva a cabo mediante la adición de la
enzima en el tanque de recolección de jugo o en el calentador de jugo o el tanque de
20 sulfitación primaria o un tercer evaporador durante el procesamiento de la caña de azúcar
tal como se muestra en la Figura 1. La mezcla de enzimas de la presente descripción
también puede ser añadida durante la trituración de la caña de azúcar o de la remolacha.

En otra forma de realización de la presente descripción, el proceso de obtención de azúcar
25 sin azufre o clarificación del jugo de azúcar se lleva a cabo mediante la adición de
enzimas y opcionalmente excipiente(s), incluyendo pero no limitando a los agentes
antiaglutinantes y estabilizadores. Debido a que la formulación es un polvo y compuesto
de proteínas (es decir, la mezcla de enzimas), los agentes anti aglutinantes tales como el
sílice pirógena, bentonita o talco se añaden al producto para evitar la formación de
30 grumos y mantener el flujo libre del producto, lo que facilita el empaque, transporte y

aplicación. Los estabilizadores tales como el cloruro de sodio se añaden para ayudar a mantener la actividad de las enzimas en la solución.

5 En otra forma de realización de la descripción, el excipiente se emplea en concentraciones que van desde 0.01% hasta aproximadamente un 20%, preferiblemente entre 1% hasta 10% aproximadamente, siendo el óptimo alrededor del 5%.

10 En otra forma de realización de la descripción, los estabilizadores son seleccionados de un grupo compuesto por cloruro de sodio, sílice pirógena, maltodextrina, trehalosa, sacarosa, lactosa, arabinosa y celulosa y o cualquier combinación de los mismos.

15 En otra forma de realización de la descripción, la mezcla apropiada de componentes durante el procesamiento del azúcar se garantiza por medio de agitadores, aireadores, etc. en el tanque.

La presente descripción, utilizando enzimas funciona con base en los siguientes principios:

20 i. Las enzimas dirigidas contra los colorantes formados en el jugo de la caña de azúcar / jugo de azúcar: Las enzimas que trabajan para conseguir la hidrolización, reducción de la oxidación, desestabilización de los vínculos en las moléculas de los colorantes (pigmentos, fenólicos, caramelos, melanoidinas, etc.) son efectivos en la reducción del color del jugo.

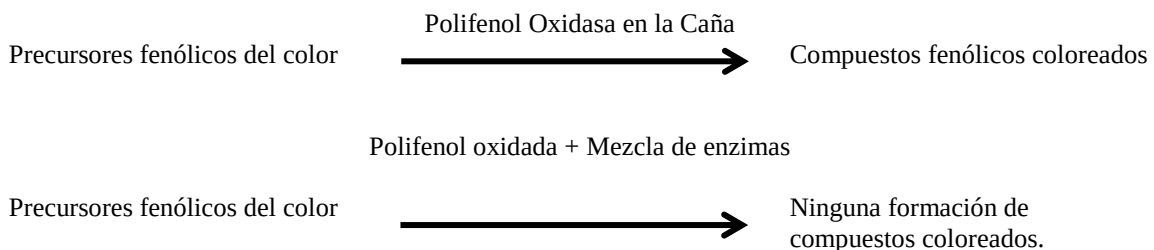
25 ii. Las enzimas que hidrolizan la materia hemicelulósica o fibras o polisacáridos en el jugo de la caña de azúcar / jugo de azúcar: las fibras y la materia vegetal hemicelulósica provocan la turbidez del jugo. Las enzimas catalizan la conversión de los polímeros hemicelulósicos a monosacáridos, eliminando así la turbiedad y aumentando la claridad del jugo. Esto también previene la formación del complejo polisacárido del colorante que reducirá el color.

30

La mayor parte de la turbiedad y color en el jugo de la caña de azúcar se atribuye a los polisacáridos que se combinan con los compuestos fenólicos. Las enzimas rompen el vínculo entre los compuestos fenólicos, polisacáridos y reducen aún más los polisacáridos a oligo y mono sacáridos que previenen la formación del colorante complejo polisacárido.

- iii. Las enzimas que evitan la oxidación de los precursores fenólicos: Las enzimas que degradan los precursores fenólicos previenen la formación de color en el jugo durante el procesamiento. Asimismo el aplastamiento del sustrato libera una enzima llamada polifenol oxidasa (PPO). Esta enzima cataliza la oxidación de los o-difenoles para producir las o-quinonas, la polimerización de los cuales produce el típico color negro, marrón o pigmentos rojos. La inhibición de PPO por inhibidores inorgánicos o biológicos reduce la formación de color en el jugo.

Las Enzimas como el polifenol oxidasa en el jugo convierten a los precursores incoloros en fenólicos coloreados. Los inhibidores del polifenol oxidasa (mezcla de enzimas de la presente descripción) impide esta reacción por medio del bloqueo del sitio activo del polifenol oxidasa y por ende reducen el color.



Ventajas de la presente descripción en el procesamiento del azúcar:

La sulfitación en el jugo de la caña de azúcar se realiza en dos pasos: Sulfitación en la etapa del jugo y la sulfitación en la etapa del jarabe. El 70% del azufre total consumido se utiliza para la sulfitación del jugo y el 30% restante se utiliza en la sulfitación del jarabe.

- 5 Si la sulfitación del jugo es reemplazada por el proceso de sustitución de azufre a base de enzimas de la presente descripción, la acumulación actual del azufre en el azúcar final es eliminada. Aunque el proceso no está libre de azufre, el producto final sería azúcar sin azufre. Esto se debe a que el azufre utilizado en la sulfitación del jarabe es mucho menor que la que se utiliza en el jugo, etapa que será eliminada durante el proceso de reemplazo
- 10 del azufre a base en enzimas y que no termina en el azúcar final. Por lo tanto, el producto final no tiene azufre.

La mezcla de enzimas de la presente descripción también puede ser añadida durante la trituración de la caña de azúcar o de la remolacha azucarera.

- 15 Los ensayos recientes en esta descripción han demostrado que la sulfitación en el jugo se reemplaza completamente con las enzimas. El papel del azufre en la sulfitación del jarabe es la de un agente blanqueador. La combinación de las enzimas y las ayudas alternas para eliminar el color en el jarabe, tal como son los productos químicos, peróxido, etc., hará del proceso, un proceso completamente libre de azufre.

20

Al utilizar el procedimiento para el procesamiento del azúcar que se detalla en la presente descripción, se reducirá hasta en un 70% el consumo de azufre, permitiendo la producción de azúcar sin azufre.

- 25 Los beneficios de la sustitución del azufre con enzimas de la presente descripción son los siguientes:

- i. Preparación del azúcar sin azufre que es de alta en calidad y venta.
- ii. Reducción en los niveles de azufre del azúcar final en límites aceptables.
- iii. Disminución en el escalado de evaporadores y ductos y reducción de la corrosión
- 30 del equipo.
- iv. Reducción en los niveles de azufre de melaza, lo cual mejora la calidad.

- v. Reducción en los niveles de azufre de los efluentes y por consiguiente mejorando las tasas de bio-metanación.
- vi. El proceso de la presente descripción no requiere la adición de una unidad adicional de funcionamiento o calefacción, tiempo de retención, cambio en el pH de lo que normalmente se utilizan en el procesamiento de la caña de azúcar.
- vii. El control del pH: en el proceso convencional del procesamiento del azúcar, la cal se añade en grandes cantidades a fin de facilitar la precipitación de las impurezas durante el paso de clarificación. Esto eleva el pH del jugo a 9.0-10.0. El gas de dióxido de azufre es bombeado dentro del jugo para bajar el pH a 7.0 y también facilitar la precipitación de las impurezas por medio de la reacción con cal para formar el sulfato de calcio. Cuando se utilizan las enzimas, la cal se añade de tal forma que el pH del jugo se mantenga en 7.0. Por lo tanto, la necesidad del azufre para mantener el pH no es necesario en el proceso de la presente descripción.
- viii. El azúcar se obtiene después de la cristalización y está compuesto de sacarosa pura. Las enzimas en comparación con los productos químicos, no se co-cristalizan con la sacarosa. Por otra parte, las enzimas se desnaturalizan durante el procesamiento del azúcar, que supone la ebullición y precipitación y, por consiguiente, no se conservan en el producto final (azúcar). Por lo tanto, la aplicación de enzimas para el procesamiento/clarificación del azúcar no causa efectos adversos en la salud de los consumidores.

Una comprensión más completa se puede obtener mediante la referencia a los siguientes ejemplos específicos, los cuales son proporcionados para fines de ilustración solamente y no están destinados a limitar el alcance de la presente descripción.

EJEMPLOS

Ejemplo 1:

Extracción del jugo de azúcar:

El Jugo de la caña de azúcar/ extracción del jugo de azúcar es un proceso continuo que regularmente involucra tres molinos/trituradoras. Los molinos pueden ser de tipo rodillo o mazos. Durante el proceso de trituración, los nodos de la caña se parten y el tallo se

aplana para extraer el jugo. El jugo se recolecta de cada molino durante la primera trituración y se denomina el jugo principal. Los jugos inferiores recolectados en las siguientes molidas son reprocesados y se les aplica agua caliente por lo general hasta en el último molino para maximizar la extracción. El jugo mixto es la combinación de los jugos recolectados junto con el jugo primario en una trituración posterior.

El jugo de caña preparado por medio de cualquier otro método de extracción es adecuado y se puede emplear en esta Descripción.

Preparación de la mezcla de enzimas:

A grandes rasgos, el proceso para la preparación de la mezcla de enzimas incluye los siguientes pasos:

1. Análisis de las muestras individuales para confirmar la actividad de la enzima.
2. Pesaje de las muestras de las enzimas conforme a la composición.
3. Mezcla de las enzimas junto con los excipientes y aditivos para obtener la mezcla de enzimas.

Alternativamente, se puede utilizar directamente una preparación multienzimática compuesta de enzimas individuales y que está disponible en el mercado. Un producto de este tipo generalmente se obtiene después del cocultivo de algunas cepas microbianas, o una sola cepa recombinante con un plásmido que codifica varias enzimas, o una sola cepa cultivada en varios sustratos produciendo la enzima consortium.

En la presente descripción, las enzimas individuales descritas anteriormente se analizan en cuanto a la actividad de las enzimas. 1g de cada enzima se pesa para preparar una mezcla de diversas combinaciones de enzimas. Cada combinación de enzimas es bien homogeneizada para producir la mezcla de enzimas. La mezcla de enzimas consta de una pluralidad de enzimas seleccionadas de un grupo compuesto por la xilanasa (exo-xilanasa, endo xilanasa o ambas), la celulasa (exo celulasa, endo celulasa, glucosidasa o la combinación de todos), hemicelulasa, β -glucanasa (Xiloglucano específico endo-1,4-beta-glucanasa, Xiloglucano específico exo-beta-1,4-glucanasa o ambos) opcionalmente junto con la glucosa oxidasa, amilasa (α -amilasa, β -amilasa, la γ -amilasa), b-

galactosidasa (α -galactosidasa, β -galactosidasa o ambos) y el α -glucanasa o su isómero pululanasa y ácido ascórbico o cualquier combinación de los mismos.

- El propósito de emplear la mezcla de enzimas, es romper los polisacáridos complejos de colorantes, de tal forma que sean fácilmente dispersadas en un componente incoloro y soluble y para prevenir la oxidación de los fenoles en sus contrapartes de color.

- Las enzimas se pueden obtener comercialmente en estado sólido o líquido. Sin embargo, el polvo es la preferida en la presente descripción para el propósito de la estabilidad y de inhibir la interacción proteína-proteína en la solución.

- Las enzimas preferidas son obtenidas de cepas microbianas y tienen suficiente actividad por gramo de proteína enzimática para solubilizar económicamente y retirar los colorantes y la materia que contribuyen a la turbidez dentro del tiempo de retención disponible.

Tabla 1: Fuentes microbianas de las enzimas empleadas en la mezcla de enzimas.

Componente	Fuente
Celulasa, xilanasa, betaglucasana	Las cepas de Tricoderma, específicamente <i>T. reesei</i> o <i>T. longbrachiatum</i> . Entre otras cepas se incluyen las especies <i>Chrysosporium</i> y <i>Humicola</i> .
α -amilasa	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus stearothermophilus</i> y otras especies de bacilos. Las fuentes fúngicas incluyen las cepas de hongos <i>Aspergillus</i> . Las cepas pueden ser adquiridas comercialmente desde bancos de cultivos como el de la "National Collection of Industrial Microorganism". Industrial.
α -glucanasa	<i>Trichoderma</i> sp.
Galactosidasa	<i>Aspergillus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>E. Coli</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Humicola</i> , <i>Lactobacillus</i>
Glucosa oxidasa	<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium italicum</i> <i>Penicillium</i> <i>Penicillium</i>

Componente	Fuente
	<i>Aspergillus niger variabile amagasakiense</i> <i>Talaromyces flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus niger</i> .

El ácido ascórbico que no es un componente de enzimas empleadas en la mezcla de enzimas de la presente descripción puede ser producido por la fermentación microbiana o fabricada sintéticamente.

Las fuentes comerciales de enzimas son de fabricantes de enzimas como
5 Novozyme, Advanced Enzymes, Genencore, Dyadic, DSM, Meiji Seiko.

Tabla 2: Los componentes de las composiciones de la mezcla de enzimas de la A a la G

Enzimas	% (p/p) enzimas individuales en la mezcla						
	A	B	C	D	E	F	G
Xilanasas (exo xilanasas o endo xilanasas)	50	40	40	30	30	25	25
La celulasa (exocelulasa o glucosidasa hidrolasa)	50	40	40	30	30	25	20
Hemicelulasa		20	10	20	15	15	15
Alfa amilasa				10	20	10	10
β glucanasa			10	10	5	15	15
Galactosidasa (alfa galactosidase)						5	5
Glucosa oxidasa						5	5
Ácido Ascórbico							0.1
Excipientes (maltodextrina o sílice pirógena).							4.9

Ejemplo 2:

10 Procedimiento para obtener jugo de caña de azúcar sin azufre/jugo de azúcar a escala de laboratorio.

a) Uso de la mezcla de enzimas de la composición "A":

100ml de jugo de caña de azúcar / jugo de azúcar se dividen en alícuotas en dos matraces cónicos. Se registra el pH inicial del jugo. Aproximadamente 30ppm de

la mezcla de enzimas 'A', que comprende el 50% p/p de la xilanasa (exo-xilanasa o endo-xilanasa) y 50% p/p de celulasa (exocelulasa o glucosidasa hidrolasa), opcionalmente junto con los excipientes se añade a uno de los matraces. El otro matraz se tomó como control. Ambos matraces se colocan en un baño de agua mantenido a 70°C hasta que la temperatura del jugo alcance los 70°C. Los matraces se mantuvieron aproximadamente a 70°C durante aproximadamente 10 minutos. Después de aproximadamente 10 minutos, los matraces son enfriados aproximadamente a 28°C (temperatura ambiente) y, posteriormente, el matraz de ensayo y de control se neutralizan a pH7 utilizando óxido de calcio (calcio). Posteriormente, los matraces se llenan y se les deja reposar a 100°C durante 45-50 minutos. Posteriormente se enfrían los matraces y el contenido filtrado y revisado por ICUMSA (Comisión Internacional de Métodos Uniformes para el Análisis del Azúcar).

15 b) Uso de la mezcla de enzimas de la composición 'B':

100ml del jugo de caña de azúcar/jugo de azúcar se dividen en alícuotas en dos matraces cónicos. Se registra el pH inicial del jugo. Aproximadamente 30ppm de la mezcla de enzimas 'B', que comprende el 40% p/p de xilanasa (exo-xilanasa o endo-xilanasa), 40% p/p de celulasa (exocelulasa o glucosidasa hidrolasa), 20% p/p de hemicelulasa, opcionalmente junto con los excipientes, se añade a uno de los matraces. El otro matraz se tomó como control. Ambos matraces se colocan en un baño de agua mantenido a 75°C hasta que la temperatura del jugo alcance los 75°C. Los matraces se mantienen a 75°C durante 15 minutos aproximadamente. Después de aproximadamente 15 minutos, los matraces son enfriados a unos 30°C (temperatura ambiente) y, posteriormente, los matraces de prueba y control se neutralizan (a pH7) utilizando óxido de calcio (cal). Posteriormente se llenan los matraces y se les deja asentarse a 100°C durante 45-60 minutos. Luego se enfrían los matraces y el contenido es filtrado y revisado por la ICUMSA (Comisión Internacional de Métodos Uniformes para el Análisis del Azúcar).

30

c) Uso de la composición de la mezcla de enzimas 'C':

100ml del jugo de caña de azúcar /jugo de azúcar se dividen en alícuotas en dos matraces cónicos. Se registra el pH inicial del jugo. Aproximadamente 30ppm de la mezcla de enzimas 'C', que comprende el 40% p/p de xilanasas (exo-xilanasas o endo-xilanasas), 40% p/p de celulasa (exocelulasa o glucosidasa hidrolasa), 10% p/p de hemicelulasa y 10% p/p de β -glucanasa, opcionalmente junto con los excipientes, se añade a uno de los matraces. El otro matraz se tomó como control. Ambos matraces se colocan en un baño de agua mantenido a 65°C hasta que la temperatura del jugo alcance los 65°C. Los matraces se mantienen a 65°C durante 10 minutos aproximadamente. Después de aproximadamente 10 minutos, los matraces son enfriados a unos 25°C (temperatura ambiente) y, posteriormente, los matraces de prueba y control se neutralizan (a pH7) utilizando óxido de calcio (cal). Posteriormente se llenan los matraces y se les deja asentarse a 100°C durante 45-60 minutos. Luego se enfrían los matraces y el contenido es filtrado y revisado por la ICUMSA (Comisión Internacional de Métodos Uniformes para el Análisis del Azúcar).

d) Uso de la composición de la mezcla de enzimas 'D':

100ml del jugo de caña de azúcar /jugo de azúcar se dividen en alícuotas en dos matraces cónicos. Se registra el pH inicial del jugo. Aproximadamente 30ppm de la mezcla de enzimas 'D', que comprende el 30% p/p de xilanasas (exo-xilanasas o endo-xilanasas), 30% p/p de celulasa (exocelulasa o glucosidasa hidrolasa), 20% p/p de hemicelulasa y 10% p/p de alfa amilasa y 10% p/p de β -glucanasa, opcionalmente junto con los excipientes, se añade a uno de los matraces. El otro matraz se tomó como control. Ambos matraces se colocan en un baño de agua mantenido a 70°C hasta que la temperatura del jugo alcance los 70°C. Los matraces se mantienen a 70°C durante 10 minutos aproximadamente. Después de aproximadamente 10 minutos, los matraces son enfriados a unos 28°C (temperatura ambiente) y, posteriormente, los matraces de prueba y control se neutralizan (a pH7) utilizando óxido de calcio (cal). Posteriormente se llenan los matraces y se les deja asentar a 100°C durante 45-50 minutos. Luego se enfrían

los matraces y el contenido es filtrado y revisado por la ICUMSA (Comisión Internacional de Métodos Uniformes para el Análisis del Azúcar).

e) Uso de la composición de la mezcla de enzimas 'E':

5 100ml del jugo de caña de azúcar /jugo de azúcar se dividen en alícuotas en dos matraces cónicos. Se registra el pH inicial del jugo. Aproximadamente 30ppm de la mezcla de enzimas 'E', que comprende el 30% p/p de xilanasas (exo-xilanasas o endo-xilanasas), 30% p/p de celulasa (exocelulasa o glucosidasa hidrolasa), 15% p/p de hemicelulasa y 20% p/p de alfa amilasa y 5% p/p de β -glucanasa, opcionalmente junto con los excipientes, se añade a uno de los matraces. El otro

10 matraz se tomó como control. Ambos matraces se colocan en un baño de agua mantenido a 70°C hasta que la temperatura del jugo alcance los 70°C. Los matraces se mantienen a 70°C durante 10 minutos aproximadamente. Después de aproximadamente 10 minutos, los matraces son enfriados a unos 28°C (temperatura ambiente) y, posteriormente, los matraces de prueba y control se

15 neutralizan (a pH7) utilizando óxido de calcio (cal). Posteriormente se llenan los matraces y se les deja asentar a 100°C durante 45-50 minutos. Luego se enfrían los matraces y el contenido es filtrado y revisado por la ICUMSA (Comisión Internacional de Métodos Uniformes para el Análisis del Azúcar).

f) Uso de la composición de la mezcla de enzimas 'F':

20 100ml del jugo de caña de azúcar /jugo de azúcar se dividen en alícuotas en dos matraces cónicos. Se registra el pH inicial del jugo. Aproximadamente 30ppm de la mezcla de enzimas 'E', que comprende el 25% p/p de xilanasas (exo-xilanasas o endo-xilanasas), 25% p/p de celulasa (exocelulasa o glucosidasa hidrolasa), 15% p/p de hemicelulasa y 10% p/p de alfa amilasa y 15% p/p de β -glucanasa, 5% p/p

25 de alfa galactosidasa y 5% de glucosa oxidasa, opcionalmente junto con los excipientes, se añade a uno de los matraces. El otro matraz se tomó como control. Ambos matraces se colocan en un baño de agua mantenido a 70°C hasta que la temperatura del jugo alcance los 70°C. Los matraces se mantienen a 70°C durante 10 minutos aproximadamente. Después de aproximadamente 10 minutos, los

30 matraces son enfriados a unos 28°C (temperatura ambiente) y, posteriormente, los matraces de prueba y control se neutralizan (a pH7) utilizando óxido de calcio

(cal). Posteriormente se llenan los matraces y se les deja asentar a 100°C durante 45-50 minutos. Luego se enfrían los matraces y el contenido es filtrado y revisado por la ICUMSA (Comisión Internacional de Métodos Uniformes para el Análisis del Azúcar).

5 g) Uso de la composición de la mezcla de enzimas 'G':

100ml del jugo de caña de azúcar /jugo de azúcar se dividen en alícuotas en dos matraces cónicos. Se registra el pH inicial del jugo. Aproximadamente 30ppm de la mezcla de enzimas 'G', que comprende el 25% p/p de xilanasa (exo-xilanasa o endo-xilanasa), 20% p/p de celulasa (exocelulasa o glucosidasa hidrolasa), 15% p/p de hemicelulasa y 10% p/p de alfa amilasa y 15% p/p de β -glucanasa, 5% p/p de alfa galactosidasa y 5% de glucosa oxidasa, 0.1 p/p de ácido ascórbico y 4.9% p/p de excipientes (maltodextrina, sílice pirógena), se añade a uno de los matraces. El otro matraz se tomó como control. Ambos matraces se colocan en un baño de agua mantenido a 70°C hasta que la temperatura del jugo alcance los 70°C. Los matraces se mantienen a 70°C durante 10 minutos aproximadamente. Después de aproximadamente 10 minutos, los matraces son enfriados a unos 28°C (temperatura ambiente) y, posteriormente, los matraces de prueba y control se neutralizan (a pH7) utilizando óxido de calcio (cal). Posteriormente se llenan los matraces y se les deja asentar a 100°C durante 45-50 minutos. Luego se enfrían los matraces y el contenido es filtrado y revisado por la ICUMSA (Comisión Internacional de Métodos Uniformes para el Análisis del Azúcar).

Ejemplo 3:

Procedimiento para la Estimación ICUMSA:

25 Para el análisis de color, se utiliza el método ICUMSA GS 1/3-7. Las muestras de jugo de caña de azúcar/ muestras de jugo de azúcar se diluyen para alcanzar 5.0 de Brix. El pH se ajusta a 7.0 con NaOH/HCl diluido. Las muestras se filtran a través de membranas de 0.45 μ m y la absorbancia se mide a 420 nm contra el agua destilada como blanco.

30 Luego se estima el color según la fórmula:

ICUMSA color = {Absorbancia/ (longitud de trayectoria de la cubeta x concentración de jugo de la caña azúcar/jugo de azúcar)} x 1000.

- El color del azúcar es una indicación de las impurezas presentes en el azúcar. Cuanto mayor es el ICUMSA mayores son las impurezas en el azúcar y, por tanto, menor es la calidad. Los límites del ICUMSA para las plantaciones de azúcar blanco o blanqueado es < 150 según la norma del Codex para los azúcares 212-1999.

ICUMSA (Resultados del jugo clarificado tratado con la mezcla de enzimas 'G' en experimentos a escala de laboratorio, tal como se describió anteriormente):

- Los resultados preliminares de esta descripción muestran que el color en el jugo de caña de azúcar/jugo de azúcar no tratado es de 28758 unidades ICUMSA y esto se reduce a 14466 unidades ICUMSA después sulfitación. La reducción del color es de 49.7%. Con la adición de la mezcla de enzimas 'G', el color del jugo de la caña de azúcar/jugo de azúcar se reduce a 9561 unidades ICUMSA lo que representa el 66.7% reducción de color cuando se compara con el jugo no tratada (Figura 2). La reducción adicional del color con las enzimas (en comparación con sulfitación) es del 18%. Esto indica que la presente descripción se puede utilizar para sustituir el azufre en el proceso de fabricación del azúcar y facilitar también una mejor eliminación de color.

- Tabla 3: Comparación de los parámetros del jugo de caña tratado con azufre y con la mezcla de enzimas 'G'.**

Parámetros	Jugo mezclado tratado con azufre	Jugo tratado con enzimas
Brix	0.2	0.6
Absorbancia @ 720 nm (Turbidez)	0.492	0.287
ICUMSA inicial (color).	28758	28758
ICUMSA final (color).	14466	9503
% de reducción del color	49.7 %	66.7 %
Pureza (%)	77.27	78.32

Ejemplo 4:**a) Validación del proceso de sustitución del azufre con una base enzimática a escala de planta utilizando la composición de la mezcla de enzimas "A":**

El ensayo a gran escala se llevó a cabo en tres niveles de dosificación de la mezcla de enzimas: 15, 30 y 45 ppm (p/v). La mezcla de enzimas compuesta de xilanasa (exo xilanasa o endo xilanasa) y celulasa (exo celulasa o celobiohidrolasa) en una concentración de 50% (p/p) cada uno, es decir, la composición de la mezcla enzimática (Tabla 2) se añade al jugo mezclado después de ser molido para maximizar el tiempo de reacción en dosis que van desde 1 ppm hasta 70 ppm con una dosis óptima de entre 15 ppm a 45 ppm. Luego se procesa el jugo conforme a los procedimientos de clarificación típica.

La extracción del jugo se lleva a cabo en cinco molinos en serie con un sistema de inhibición estándar. El jugo de la trituradora y el primer molino (jugo de la caña de azúcar sin diluir) se combinan para formar el jugo primario. La mezcla de enzimas se añade al jugo mezclado en el tanque de recolección cuando la temperatura esté alrededor de 40°C. Luego se calienta el jugo y tarda unos 2-3 minutos en llegar al tanque de sulfitación en donde la temperatura promedio es de 60°C a 70°C. En las condiciones de operación prevalecientes, el jugo mixto requiere entre 2 a 2.5 minutos para entrar en el tanque sulfitación. El tiempo de permanencia en el tanque sulfitación es de unos 7-10 minutos y no más de 15 minutos y la temperatura oscila entre 60°C a 70°C y no más de 80°C o no menos de 50°C. Luego se enfría el jugo a 28°C (temperatura ambiente). La lechada de cal (hidróxido de calcio) se añade para elevar el pH del jugo en aproximadamente 5.0-5.5 hasta aproximadamente 7.1 a 7.2. De tal forma que la mezcla de enzimas tenga entre 12 a 15 minutos de tiempo de reacción a un nivel de actividad de prácticamente un 100%. No se añade azufre. El jugo encalado es luego bombeado a los tanques de retención y luego a los calentadores del jugo, en donde la temperatura aumenta a unos 100°C - 105°C, desactivando de esta forma la mezcla de enzimas. El tiempo de reacción disponible en un pH de aproximadamente de 7.1 a 7.2 y no más de 7.5 de aproximadamente 14 a 16 minutos. El floculante aniónico (BASf) disponible en el mercado se añade para

5 acelerar el asentamiento del sedimento y otras partículas y materia coloidal en el clarificador. El tiempo de permanencia en el clarificador es aproximadamente 80 a 90 minutos. Este paso es seguido de un paso opcional de filtrado por medio de la filtración por membrana, utilizando un filtro de prensa o centrifugación o cualquier combinación de los mismos. El sobrenadante claro (jugo clarificado) se bombea luego hacia la estación del evaporador a concentrarse antes de que comience la ebullición del azúcar.

10 Las muestras del jugo mezclado, del jugo claro y de los azúcares finales son recolectados y analizados por medio de diferentes parámetros. Estos parámetros son comparados con las muestras recolectadas durante la sulfitación. Las mejoras significativas en los rendimientos se obtienen junto con la reducción del sedimento prensado sin comprometer el color final del azúcar. El contenido de azufre es eliminado completamente en el paso de clarificación del jugo, lo que se traduce en un
15 ahorro adicional al emplear poca energía y menor cantidad de cal para lograr resultados similares a los de la sulfitación.

b) Validación del proceso de sustitución del azufre con una base enzimática a escala de la planta utilizando la composición de la mezcla de enzimas 'B':

20 La mezcla de enzimas compuesta por xilanasa (40% p/p de xilanasa exo o endo xilanasa), la celulasa (40% p/p o exocelulasa o glucosidasa hidrolasa) y hemicelulasa (20% p/p), es decir, la composición de la mezcla de enzimas B (Tabla 2) se añade al jugo mezclado después de ser molido para maximizar el tiempo de reacción en dosis que van desde 15ppm, 30 ppm y 45ppm. Luego se procesa el jugo conforme a los procedimientos de clarificación típica.

25 La extracción del jugo se lleva a cabo en cinco molinos en serie con un sistema de inhibición estándar. El jugo de la trituradora y el primer molino (jugo de la caña de azúcar sin diluir) se combinan para formar el jugo primario. La mezcla de enzimas se añade al jugo mezclado en el tanque de recolección cuando la temperatura esté
30 alrededor de 40°C. Luego se calienta el jugo y tarda unos 2-3 minutos en llegar al

tanque de sulfitación en donde la temperatura es de 60. En las condiciones de operación prevalecientes, el jugo mixto requiere entre 2 a 2.5 minutos para entrar en el tanque sulfitación. El tiempo de permanencia en el tanque sulfitación es de unos 7 minutos y la temperatura de 60°C. Luego se enfría el jugo a 25°C (temperatura ambiente). La lechada de cal (hidróxido de calcio) se añade para elevar el pH del jugo en aproximadamente 5.0-5.5 hasta aproximadamente 7.1 a 7.2. De tal forma que la mezcla de enzimas tenga aproximadamente 12 minutos de tiempo de reacción a un nivel de actividad de prácticamente un 100%. No se añade azufre. El jugo encalado es luego bombeado a los tanques de retención y luego a los calentadores del jugo, en donde la temperatura aumenta a unos 100°C, desactivando de esta forma la mezcla de enzimas. El tiempo de reacción disponible en un pH de aproximadamente de 7.1 a 7.2 y no más de 7.5 es de aproximadamente 14 minutos. El floculante aniónico (BASF) disponible en el mercado se añade para acelerar el asentamiento del sedimento y otras partículas y materia coloidal en el clarificador. El tiempo de residencia en el clarificador es aproximadamente 80 minutos. Este paso es seguido de un paso opcional de filtrado por medio de la filtración por membrana, utilizando un filtro de prensa o centrifugación o cualquier combinación de los mismos. El sobrenadante claro (jugo clarificado) se bombea luego hacia la estación del evaporador a concentrarse antes de que comience la ebullición del azúcar.

Las muestras del jugo mezclado, del jugo claro y de los azúcares finales son recolectados y analizados por medio de diferentes parámetros. Estos parámetros son comparados con las muestras recolectadas durante la sulfitación. Las mejoras significativas en los rendimientos se obtienen junto con la reducción del sedimento prensado sin comprometer el color final del azúcar. El contenido de azufre es eliminado completamente en el paso de clarificación del jugo, lo que se traduce en ahorro adicional al emplear poca energía y menor cantidad de cal para lograr resultados similares a los de la sulfitación.

c) Validación del proceso de sustitución del azufre con una base enzimática a escala de la planta utilizando la composición de la mezcla de enzimas 'C':

La mezcla de enzimas compuesta por xilanasa (40% p/p de xilanasa exo o endo xilanasa), la celulasa (40% p/p o exocelulasa o glucosidasa hidrolasa) y hemicelulasa (10% p/p) y β glucanasa (10% p/p), es decir, la composición de la mezcla de enzimas C (Tabla 2) se añade al jugo mezclado después de ser molido para maximizar el tiempo de reacción en dosis que van desde 15ppm, 30 ppm y 45ppm. Luego se procesa el jugo conforme a los procedimientos de clarificación típica.

La extracción del jugo se lleva a cabo en cinco molinos en serie con un sistema de inhibición estándar. El jugo de la trituradora y el primer molino (jugo de la caña de azúcar sin diluir) se combinan para formar el jugo primario. La mezcla de enzimas se añade al jugo mezclado en el tanque de recolección cuando la temperatura esté alrededor de 40°C. Luego se calienta el jugo y tarda unos 2-3 minutos en llegar al tanque de sulfitación en donde la temperatura es de 70. En las condiciones de operación prevalecientes, el jugo mixto requiere entre 2 a 2.5 minutos para entrar en el tanque sulfitación. El tiempo de permanencia en el tanque sulfitación es de unos 10 minutos y la temperatura de 70°C. Luego se enfría el jugo a 30°C (temperatura ambiente). La lechada de cal (hidróxido de calcio) se añade para elevar el pH del jugo en aproximadamente 5.0-5.5 hasta aproximadamente 7.1 a 7.2. De tal forma que la mezcla de enzimas tenga aproximadamente 15 minutos de tiempo de reacción a un nivel de actividad de prácticamente un 100%. No se añade azufre. El jugo encalado es luego bombeado a los tanques de retención y luego a los calentadores del jugo, en donde la temperatura aumenta a unos 105°C, desactivando de esta forma la mezcla de enzimas. El tiempo de reacción disponible en un pH de aproximadamente de 7.1 a 7.2 y no más de 7.5 es de aproximadamente 16 minutos. El floculante aniónico (BASF) disponible en el mercado se añade para acelerar el asentamiento del sedimento y otras partículas y materia coloidal en el clarificador. El tiempo de residencia en el clarificador es aproximadamente 90 minutos. Este paso es seguido de un paso opcional de filtrado por medio de la filtración por membrana, utilizando un filtro de prensa o centrifugación o cualquier combinación de los mismos. El

sobrenadante claro (jugo clarificado) se bombea luego hacia la estación del evaporador a concentrarse antes de que comience la ebullición del azúcar.

Las muestras del jugo mezclado, del jugo claro y de los azúcares finales son recolectados y analizados por medio de diferentes parámetros. Estos parámetros son comparados con las muestras recolectadas durante la sulfitación. Las mejoras significativas en los rendimientos se obtienen junto con la reducción del sedimento prensado sin comprometer el color final del azúcar. El contenido de azufre es eliminado completamente en el paso de clarificación del jugo, lo que se traduce en ahorro adicional al emplear poca energía y menor cantidad de cal para lograr resultados similares a los de la sulfitación.

d) Validación del proceso de sustitución del azufre con una base enzimática a escala de la planta utilizando la composición de la mezcla de enzimas 'D':

La mezcla de enzimas compuesta por xilanasa (30% p/p de exo-xilanasa o endo-xilanasa), la celulasa (30% p/p de exocelulasa o glucosidasa hidrolasa) y hemicelulasa (20% p/p) y β glucanasa (10% p/p), es decir, la composición de la mezcla de enzimas D (Tabla 2) se añade al jugo mezclado después de ser molido para maximizar el tiempo de reacción en dosis que van desde 15ppm, 30 ppm y 45ppm. Luego se procesa el jugo conforme a los procedimientos de clarificación típica.

La extracción del jugo se lleva a cabo en cinco molinos en serie con un sistema de inhibición estándar. El jugo de la trituradora y el primer molino (jugo de la caña de azúcar sin diluir) se combinan para formar el jugo primario. La mezcla de enzimas se añade al jugo mezclado en el tanque de recolección cuando la temperatura esté alrededor de 40°C. Luego se calienta el jugo y tarda unos 2-3 minutos en llegar al tanque de sulfitación en donde la temperatura es de entre 60°C a 70°C. En las condiciones de operación prevalecientes, el jugo mixto requiere entre 2 a 2.5 minutos para entrar en el tanque sulfitación. El tiempo de permanencia en el tanque sulfitación es de unos 15 minutos y la temperatura es de aproximadamente 80°C. Luego se enfría el jugo a 28°C (temperatura ambiente). La lechada de cal (hidróxido de calcio) se añade para elevar el pH del jugo en aproximadamente 5.0-5.5 hasta aproximadamente 7.1 a 7.2. De tal forma que la mezcla de enzimas tenga

aproximadamente 12-15 minutos de tiempo de reacción a un nivel de actividad de prácticamente un 100%. No se añade azufre. El jugo encalado es luego bombeado a los tanques de retención y luego a los calentadores del jugo, en donde la temperatura aumenta a unos 100° - 105°C, desactivando de esta forma la mezcla de enzimas. El tiempo de reacción disponible en un pH de aproximadamente de 7.1 a 7.2 y no más de 7.5 es de aproximadamente 14 a 16 minutos. El floculante aniónico (BASF) disponible en el mercado se añade para acelerar el asentamiento del sedimento y otras partículas y materia coloidal en el clarificador. El tiempo de residencia en el clarificador es aproximadamente 80 a 90 minutos. Este paso es seguido de un paso opcional de filtrado por medio de la filtración por membrana, utilizando un filtro de prensa o centrifugación o cualquier combinación de los mismos. El sobrenadante claro (jugo clarificado) se bombea luego hacia la estación del evaporador a concentrarse antes de que comience la ebullición del azúcar.

Las muestras del jugo mezclado, del jugo claro y de los azúcares finales son recolectados y analizados por medio de diferentes parámetros. Estos parámetros son comparados con las muestras recolectadas durante la sulfitación. Las mejoras significativas en los rendimientos se obtienen junto con la reducción del sedimento prensado sin comprometer el color final del azúcar. El contenido de azufre es eliminado completamente en el paso de clarificación del jugo, lo que se traduce en ahorro adicional al emplear poca energía y menor cantidad de cal para lograr resultados similares a los de la sulfitación.

e) Validación del proceso de sustitución del azufre con una base enzimática a escala de la planta utilizando la composición de la mezcla de enzimas 'E':

La mezcla de enzimas compuesta por xilanasa (30% p/p de exo-xilanasa o endo-xilanasa), la celulasa (30% p/p de exocelulasa o glucosidasa hidrolasa) y hemicelulasa (15% p/p) y β glucanasa (5% p/p), es decir, la composición de la mezcla de enzimas E (Tabla 2) se añade al jugo mezclado después de ser molido para maximizar el tiempo de reacción en dosis que van desde 15ppm, 30ppm y 45ppm. Luego se procesa el jugo conforme a los procedimientos de clarificación típica.

La extracción del jugo se lleva a cabo en cinco molinos en serie con un sistema de inhibición estándar. El jugo de la trituradora y el primer molino (jugo de la caña de azúcar sin diluir) se combinan para formar el jugo primario. La mezcla de enzimas se añade al jugo mezclado en el tanque de recolección cuando la temperatura esté
5 alrededor de 40°C. Luego se calienta el jugo y tarda unos 2-3 minutos en llegar al tanque de sulfitación en donde la temperatura es de entre 60°C a 70°C. En las condiciones de operación prevalecientes, el jugo mixto requiere entre 2 a 2.5 minutos para entrar en el tanque sulfitación. El tiempo de permanencia en el tanque sulfitación es de unos 7-10 minutos y no más de 15 minutos y la temperatura es de
10 aproximadamente 50°C. Luego se enfría el jugo a 28°C (temperatura ambiente). La lechada de cal (hidróxido de calcio) se añade para elevar el pH del jugo en aproximadamente 5.0-5.5 hasta aproximadamente 7.1 a 7.2. De tal forma que la mezcla de enzimas tenga aproximadamente 12-15 minutos de tiempo de reacción a un nivel de actividad de prácticamente un 100%. No se añade azufre. El jugo
15 encalado es luego bombeado a los tanques de retención y luego a los calentadores del jugo, en donde la temperatura aumenta a unos 100° - 105°C, desactivando de esta forma la mezcla de enzimas. El tiempo de reacción disponible en un pH de aproximadamente de 7.1 a 7.2 y no más de 7.5 es de aproximadamente 14 a 16 minutos. El floculante aniónico (BASF) disponible en el mercado se añade para
20 acelerar el asentamiento del sedimento y otras partículas y materia coloidal en el clarificador. El tiempo de residencia en el clarificador es aproximadamente 80 a 90 minutos. Este paso es seguido de un paso opcional de filtrado por medio de la filtración por membrana, utilizando un filtro de prensa o centrifugación o cualquier combinación de los mismos. El sobrenadante claro (jugo clarificado) se bombea luego
25 hacia la estación del evaporador a concentrarse antes de que comience la ebullición del azúcar.

Las muestras del jugo mezclado, del jugo claro y de los azúcares finales son recolectados y analizados por medio de diferentes parámetros. Estos parámetros son comparados con las muestras recolectadas durante la sulfitación. Las mejoras
30 significativas en los rendimientos se obtienen junto con la reducción del sedimento prensado sin comprometer el color final del azúcar. El contenido de azufre es

eliminado completamente en el paso de clarificación del jugo, lo que se traduce en ahorro adicional al emplear poca energía y menor cantidad de cal para lograr resultados similares a los de la sulfitación.

5 **f) Validación del proceso de sustitución del azufre con una base enzimática a escala de la planta utilizando la composición de la mezcla de enzimas 'F':**

La mezcla de enzimas compuesta por xilanasa (25% p/p de exo-xilanasa o endo-xilanasa), la celulasa (25% p/p de exocelulasa o glucosidasa hidrolasa) y hemicelulasa (10% p/p) y β glucanasa (15% p/p), alfa galactosidasa (5% p/p) y glucosidasa (5% p/p), es decir, la composición de la mezcla de enzimas F (Tabla 2) se añade al jugo
10 mezclado después de ser molido para maximizar el tiempo de reacción en dosis que van desde 15ppm, 30ppm y 45ppm. Luego se procesa el jugo conforme a los procedimientos de clarificación típica.

La extracción del jugo se lleva a cabo en cinco molinos en serie con un sistema de
15 inhibición estándar. El jugo de la trituradora y el primer molino (jugo de la caña de azúcar sin diluir) se combinan para formar el jugo primario. La mezcla de enzimas se añade al jugo mezclado en el tanque de recolección cuando la temperatura está alrededor de 40°C. Luego se calienta el jugo y tarda unos 2-3 minutos en llegar al tanque de sulfitación en donde la temperatura es de entre 60°C a 70°C. En las
20 condiciones de operación prevalecientes, el jugo mixto requiere entre 2 a 2.5 minutos para entrar en el tanque sulfitación. El tiempo de permanencia en el tanque sulfitación es de unos 7-10 minutos y no más de 15 minutos y la temperatura es de aproximadamente 60°C a 70°C y no más de 80°C o no menos de 50°C. Luego se enfría el jugo a 28°C (temperatura ambiente). La lechada de cal (hidróxido de calcio)
25 se añade para elevar el pH del jugo en aproximadamente 5.0-5.5 hasta aproximadamente 7.1 a 7.2. De tal forma que la mezcla de enzimas tenga aproximadamente 12-15 minutos de tiempo de reacción a un nivel de actividad de prácticamente un 100%. No se añade azufre. El jugo encalado es luego bombeado a los tanques de retención y luego a los calentadores del jugo, en donde la
30 temperatura aumenta a unos 100° - 105°C, desactivando de esta forma la mezcla de enzimas. El tiempo de reacción disponible en un pH de aproximadamente de 7.1 a 7.2

y no más de 7.5 es de aproximadamente 14 a 16 minutos. El floculante aniónico (BASF) disponible en el mercado se añade para acelerar el asentamiento del sedimento y otras partículas y materia coloidal en el clarificador. El tiempo de residencia en el clarificador es aproximadamente 80 a 90 minutos. Este paso es
 5 seguido de un paso opcional de filtrado por medio de la filtración por membrana, utilizando un filtro de prensa o centrifugación o cualquier combinación de los mismos. El sobrenadante claro (jugo clarificado) se bombea luego hacia la estación del evaporador a concentrarse antes de que comience la ebullición del azúcar.

Las muestras del jugo mezclado, del jugo claro y de los azúcares finales son
 10 recolectados y analizados por medio de diferentes parámetros. Estos parámetros son comparados con las muestras recolectadas durante la sulfitación. Las mejoras significativas en los rendimientos se obtienen junto con la reducción del sedimento prensado sin comprometer el color final del azúcar. El contenido de azufre es eliminado completamente en el paso de clarificación del jugo, lo que se traduce en
 15 ahorro adicional al emplear poca energía y menor cantidad de cal para lograr resultados similares a los de la sulfitación.

g) Validación del proceso de sustitución del azufre con una base enzimática a escala de la planta utilizando la composición de la mezcla de enzimas 'G':

20 La mezcla de enzimas compuesta por xilanasa (25% p/p de exo-xilanasa o endo-xilanasa), celulasa (20% p/p de exocelulasa o glucosidasa hidrolasa) y hemicelulasa (15% p/p) y β glucanasa (15% p/p), alfa galactosidasa (5% p/p) glucosidasa (5% p/p), ácido ascórbico (0.1% p/p) y excipiente-maltodextrina, sílice pirógena (4.9% p/p), es decir, la composición de la mezcla de enzimas G (Tabla 2) se añade al jugo mezclado
 25 después de ser molido para maximizar el tiempo de reacción en dosis que van desde 15ppm, 30ppm y 45ppm. Luego se procesa el jugo conforme a los procedimientos de clarificación típica.

La extracción del jugo se lleva a cabo en cinco molinos en serie con un sistema de inhibición estándar. El jugo de la trituradora y el primer molino (jugo de la caña de
 30 azúcar sin diluir) se combinan para formar el jugo primario. La mezcla de enzimas se añade al jugo mezclado en el tanque de recolección cuando la temperatura está

alrededor de 40°C. Luego se calienta el jugo y tarda unos 2-3 minutos en llegar al tanque de sulfitación en donde la temperatura es de entre 60°C a 70°C. En las condiciones de operación prevalecientes, el jugo mixto requiere entre 2 a 2.5 minutos para entrar en el tanque sulfitación. El tiempo de permanencia en el tanque sulfitación es de unos 7-10 minutos y no más de 15 minutos y la temperatura es de aproximadamente 60°C a 70°C y no más de 80°C o no menos de 50°C. Luego se enfría el jugo a 28°C (temperatura ambiente). La lechada de cal (hidróxido de calcio) se añade para elevar el pH del jugo en aproximadamente 5.0-5.5 hasta aproximadamente 7.1 a 7.2. De tal forma que la mezcla de enzimas tenga aproximadamente 12-15 minutos de tiempo de reacción a un nivel de actividad de prácticamente un 100%. No se añade azufre. El jugo encalado es luego bombeado a los tanques de retención y luego a los calentadores del jugo, en donde la temperatura aumenta a unos 100°-105°C, desactivando de esta forma la mezcla de enzimas. El tiempo de reacción disponible en un pH de aproximadamente de 7.1 a 7.2 y no más de 7.5 es de aproximadamente 14 a 16 minutos. El floculante aniónico (BASF) disponible en el mercado se añade para acelerar el asentamiento del sedimento y otras partículas y materia coloidal en el clarificador. El tiempo de residencia en el clarificador es aproximadamente 80 a 90 minutos. Este paso es seguido de un paso opcional de filtrado por medio de la filtración por membrana, utilizando un filtro de prensa o centrifugación o cualquier combinación de los mismos. El sobrenadante claro (jugo clarificado) se bombea luego hacia la estación del evaporador a concentrarse antes de que comience la ebullición del azúcar.

Las muestras del jugo mezclado, del jugo claro y de los azúcares finales son recolectados y analizados por medio de diferentes parámetros. Estos parámetros son comparados con las muestras recolectadas durante la sulfitación. Las mejoras significativas en los rendimientos se obtienen junto con la reducción del sedimento prensado sin comprometer el color final del azúcar. El contenido de azufre es eliminado completamente en el paso de clarificación del jugo, lo que se traduce en ahorro adicional al emplear poca energía y menor cantidad de cal para lograr resultados similares a los de la sulfitación.

- En las figuras 3 y 4 se compara el color y la pureza del jugo claro tratado con la mezcla de enzimas 'G' contra el jugo claro sometido al proceso de sulfitación. Las figuras 5 y 6 comparan el color y el porcentaje de recuperación del azúcar final obtenido por medio del proceso de sulfitación y el porcentaje obtenido por medio de la aplicación de la mezcla de enzimas 'G'.

Ejemplo 5:

Comparación del proceso de sustitución del azufre con una base enzimática con el proceso de sulfitación para clarificar el jugo de la caña de azúcar (a escala de la planta).

- El proceso de sustitución del azufre a base de enzimas para aclarar el jugo del azúcar es más ventajoso que la sulfitación, en cuanto a los aspectos de la escala decreciente de evaporadores y tuberías, reducción de la corrosión, mejoramiento de las tasas de biometanización y la calidad del azúcar.

Tabla 4: Comparación del proceso enzimático con el proceso de sulfitación

El parámetro	Sulfitación	Método enzimático utilizando la mezcla de enzimas 'G'
Pureza del jugo claro (%)	82.78	85.39
Óxido de calcio en un jugo claro (ppm)	1180	1050
Aumento de óxido de calcio del jugo mezclado con jugo claro (ppm)	370	227.5
Cantidad de la torta de filtración (en toneladas)	277.43	96.4
El consumo de cal (en toneladas)	0.16	0.1
Recuperación (%)	10.04	10.58

- El cuadro anterior muestra que la cantidad de cal consumida y la cantidad de cal presente en el jugo claro se ha reducido considerablemente en el proceso de la presente descripción utilizando enzimas. Por lo tanto, se reducirá en el aumento de tuberías y equipo para el proceso de la presente descripción, provocado debido a la deposición

de sales de azufre, potasio o sales de calcio y la reacción del azufre con el potasio y otros iones.

Ejemplo 6:

- 5 **Efecto de la dosis de la mezcla de enzimas 'G' en la reducción del color del jugo:** El efecto de la dosis de la mezcla de enzimas se ha estudiado con relación a la reducción del color y mejora de la pureza en el jugo. La mezcla de enzimas se dosifica en 15 ppm, 30 ppm y 45 ppm del jugo mezclado en la escala de la planta. El jugo claro jugo obtenido después de la filtración se analiza para por los parámetros. Los datos se representan en la
- 10 siguiente tabla:

Tabla 5: Análisis del jugo de azúcar mezclado y el jugo de azúcar claro.

No. S.	Indicaciones	Sin enzimas	Con la Mezcla de enzimas 'G'		
			15 ppm (p/v)	30 ppm (p/v).	45 ppm (p/v)
1	Análisis del jugo mixto				
	Brix	14.29	14.42	15.02	14.48
	Sacarosa por polarización - Pol	11.77	11.9	12.49	12.3
	Pureza	82.38	82.52	83,15	83.78
2	Análisis de jugo claro				
	Brix	14.46	15.74	14.7	14.72
	Sacarosa por polarización - Pol	11.97	13.79	12,52	12.44
	Pureza	82.78	84.48	85.17	87.61
3	Óxido de calcio en jugo claro en ppm.		1180	1090	1010
4	Color del Azúcar (ICUMSA)	132	136	132	107
5	Transparencia del jugo claro	17.3	20.3	20.6	24.2
6	Turbidez del jugo claro	20.1	17.5	11.4	11.4
7	Jugo claro (ICUMSA)	12810	12750	9649	8594
8	Aumento de la pureza del jugo mezclado al jugo claro.	0.4	1.96	2.02	3.83

- 15 En el cuadro anterior, es evidente que con el aumento de la dosificación de la mezcla de enzimas, se reduce el color y la turbidez del jugo de azúcar clarificado y la pureza aumenta.

Ejemplo 7:**Efecto de las enzimas individuales en la disminución del color del jugo de azúcar en comparación con el efecto sinérgico de la mezcla de enzimas en el color del jugo:**

Con el propósito de poder estudiar el efecto de las enzimas individuales sobre el color del jugo en las muestras del ensayo, las enzimas se añaden al jugo de caña de azúcar en aproximadamente 30 ppm de dosificación, incubados durante aproximadamente 15 minutos a una temperatura de alrededor de 50°C. El pH del jugo se ajusta aproximadamente a 5.0 antes de la adición de la enzima. Tras la incubación, el jugo se enfría y se añade la cal para neutralizar el pH y el jugo se calienta a unos 100°C durante unos 50 minutos. Luego, se filtra la solución y el color se calcula mediante el método estándar de la ICUMSA.

Tabla 6: Estimación del color del jugo de azúcar tratado con enzimas individuales

	Prueba	Volumen del Jugo (ml)	Enzima (ppm) % (p/p)	ICUMSA	% de Reducción
1	Control (ninguna enzima)	25	0	29000	-
2	Celulasa	25	30	28800	0.6
3	Amilasa	25	30	28278	2.4
4	Hemicelulasa	25	30	27578	4.9
5	Xilanasa	25	30	27953	3.6
6	Beta glucanasa	25	30	29415	-0,5
7	Alfa galactosidasa	25	30	28188	2.8
8	Glucosa oxidasa	25	30	27753	4.3

Los resultados anteriores indican que la adición de enzimas individuales no tiene efecto significativo sobre la reducción de color del jugo. Esto puede atribuirse a cada enzima actuando sobre un componente específico, dicha reducción no tiene ningún efecto significativo sobre el color del jugo.

El efecto sinérgico de las enzimas se estudia por medio de la adición de enzimas en distintas combinaciones para la pluralidad de jugo. Las combinaciones/mezclas de

enzimas se agregan a 25 ml de jugo de caña de azúcar en aproximadamente 30 ppm de dosificación, incubados durante unos 15 minutos aproximadamente a 50°C. El pH del jugo se ajusta a aproximadamente 5.0 antes de la adición de las enzimas. Luego de la incubación, el jugo se enfría, se agrega la cal para neutralizar el pH y el jugo se calienta a
 5 unos 100°C durante unos 50 minutos. Posteriormente la solución es filtrada y el color estándar se calcula mediante el método ICUMSA.

Tabla 7: Análisis del color y la turbidez en el jugo de azúcar tratado con las composiciones de la mezcla de enzimas de la A a la G.

No. Sl.	Nombre de la Mezcla de enzimas	Dosis (ppm)	Turbidez	ICUMSA	% de Reducción
1	Control (sin enzimas)	0	0.0333	29000	0
2	A	30	0.0307	25520	12
3	B	30	0.027	24650	15
4	C	30	0.0286	26680	8
5	D	30	0.0246	24070	17
6	E	30	0.028	24070	17
7	F	30	0.0232	22620	22
8	G	30	0.022	22040	24

A partir de los resultados anteriores, es evidente que el porcentaje de reducción en los valores ICUMSA del jugo clarificado es mucho mayor en el caso de la combinación de las enzimas - A,B,C,D,E,F,G cuando se compara con los valores del jugo de azúcar ICUMSA que se aclaró utilizando distintas enzimas individuales. Esto demuestra que dichas combinaciones de enzimas son composiciones sinérgicas y no simplemente composiciones aditivas.

15 **Ejemplo 8:**

El efecto del ácido ascórbico en la combinación con las enzimas de despolimerización de carbohidratos sobre la eliminación del color en el jugo de la caña de azúcar / jugo de azúcar.

En la muestra de prueba, la mezcla de enzimas F arriba mencionada se agrega al jugo de
 20 caña de azúcar en aproximadamente 30 ppm de dosificación, se incubó durante unos 15

minutos aproximadamente a 50°C, junto con el ácido ascórbico en diferentes concentraciones. El pH del jugo se ajusta a aproximadamente 5.0 antes de la adición de las enzimas. Después de unos 15 minutos, se agrega la cal para neutralizar el pH y el jugo se calienta a unos 100°C durante unos 50 minutos. Luego, la solución es filtrada y el color se estima por medio del método estándar de ICUMSA.

El control para este experimento consistió de jugo tratado con cal pero no con enzimas.

Tabla 8: Análisis del color del jugo de azúcar tratado con la mezcla de enzimas F y diferentes concentraciones de ácido ascórbico

Prueba	ICUMSA	% de Reducción
Control - sin enzimas	30112	0.0
Control de la mezcla de enzimas F	23908	20.6
Enzimas +0.015% p/v de ácido ascórbico	22794	24.3
Enzimas + 0.03% p/v de ácido ascórbico	23005	23.6
Enzimas +0.05% p/v de ácido ascórbico	22855	24.1
Enzimas 0.07% p/v de ácido ascórbico	23186	23.0
Enzimas +0.1% p/v de ácido ascórbico	22794.78	24.3
0.1% Ácido ascórbico	29690	1.4

El ácido ascórbico a 0.015% p/v a 0.1% junto con las enzimas se ha encontrado que es el más eficaz en la reducción del color en jugo de la caña de azúcar.

Ejemplo 9:

Proceso para la fabricación del azúcar de la remolacha azucarera que incluye el uso de la mezcla de enzimas (Figura 7).

Las remolachas azucareras se lavan, se parten en rodajas, se rallan y se extrae el jugo utilizando agua caliente a una temperatura de entre 50°C a 70°C, durante la cual el pH del jugo es de aproximadamente 7 y el tiempo de retención es de unos 2 a 5 minutos aproximadamente. Luego se filtra el jugo. En lugar de seguir el paso de someter el jugo de azúcar al proceso convencional de sulfitación con gas de dióxido de azufre, se añade al jugo de azúcar cualquiera de las composiciones de las mezclas enzimáticas contenidas en

la presente descripción para remover el color, turbidez y otras impurezas, en donde la temperatura en la que se cumple con este paso se mantiene a 80°C durante una duración de unos 10 minutos y en el cual el jugo de azúcar tiene un pH de 7. El jugo clarificado/transparente resultante se somete a múltiples etapas de evaporación. El proceso de evaporación de múltiples etapas se lleva a cabo para concentrar la sacarosa en el jugo eliminando el agua. Esto se lleva a cabo en una serie de 5 evaporadores. El primer evaporador se calienta con vapor de las calderas y el vapor del agua evaporada en el primer evaporador se utiliza para calentar el segundo evaporador y así sucesivamente. Debido a que existe una disminución consecuente en el calor debido a la pérdida de calor de un evaporador al otro evaporador, dando lugar a una disminución en la presión. Esto permite que el jugo hierva a temperaturas inferiores a medida que pasa.

Después de la evaporación, se obtiene un jugo espeso que contiene las concentraciones de sacarosa de alrededor del 55%-65%. Posteriormente, el jarabe resultante es opcionalmente tratado con cualquiera de las composiciones de la mezcla de enzimas de la 'A' a la 'G', y posteriormente cristalizado para obtener el azúcar blanco cristalizado.

Proceso para la fabricación del azúcar a partir de azúcar sin refinar, lo que implica el uso de la mezcla de enzimas (Figura 8).

El azúcar sin refinar es en primer lugar sometido a la afinación o lavado a una temperatura alrededor de los 85°C durante 2 a 3 minutos aproximadamente, en la cual el pH del azúcar sin refinar es entre aproximadamente 7.2 a 8. El azúcar sin refinar lavada se disolvió en agua para obtener el jugo de azúcar que luego se purificó con lechada de cal aproximadamente a 100°C durante 2 a 3 minutos aproximadamente, en donde el pH del jugo es de aproximadamente 8. Luego se filtra el jugo purificado. El jugo filtrado se clarifica por medio del tratamiento con cualquiera de las composiciones de la mezcla de enzimas de la 'A' a la 'G', a una temperatura de aproximadamente 70 °C, con una duración de unos 10 minutos, en el cual el pH del jugo es de alrededor de 7, en lugar de ser sometido a procesos convencionales como sulfitación y uso de resinas de intercambio de iones. El jugo clarificado resultante se hierva para obtener el jarabe que es nuevamente opcionalmente tratado con cualquiera de las composiciones de la mezcla de enzimas de la

presente descripción. Posteriormente, el jarabe clarificado se cristaliza y se centrifuga para obtener el azúcar blanco.

- Los ejemplos proporcionados en este documento no deben interpretarse ni limitarse a la
- 5 mezcla de las enzimas combinadas *per se*, tal como se describe en estas secciones. Estos ejemplos son proporcionados para fines ilustrativos únicamente y deben leerse en conjunto con la descripción detallada de la presente descripción. Por lo tanto, un experto en la técnica podrá ampliar la viabilidad de una mezcla de enzimas similar o cualquier otra combinación variada de mezclas enzimáticas además de las combinaciones de la
- 10 mezcla de enzimas tal como se presenta en los ejemplos proporcionados en este documento.

**"UNA COMPOSICIÓN, PROCESO Y UN KIT PARA EL PROCESAMIENTO
DEL AZÚCAR"**

RESUMEN

- 5 La presente descripción se refiere a un producto de sustitución de azufre con una base enzimática, un proceso de sustitución de azufre con una base enzimática y un kit que se puede utilizar en el procesamiento del azúcar. La presente descripción también se relaciona con una composición que comprende una mezcla de enzimas empleadas en el proceso para la obtención de un producto para la sustitución del azufre; y un producto
- 10 final obtenido después del procesamiento del azúcar.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PCT1434-SDsr	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/IPEA/416
International application No. PCT/IB2014/061982	International filing date (<i>day/month/year</i>) 05.06.2014	Priority date (<i>day/month/year</i>) 06.06.2013	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C13B20/00			
Applicant Richcore Lifesciences Pvt. Ltd.			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ (<i>sent to the applicant and to the International Bureau</i>) a total of <u>20</u> sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority, unless those sheets were superseded or cancelled, and any accompanying letters (see Rules 46.5, 66.8, 70.16, 91.2, and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets containing rectifications, where the decision was made by this Authority not to take them into account because they were not authorized by or notified to this Authority at the time when this Authority began to draw up this report, and any accompanying letters (Rules 66.4bis, 70.2(e), 70.16 and 91.2). ☐ superseded sheets and any accompanying letters, where this Authority either considers that the superseding sheets contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, or the superseding sheets were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box (see Rule 70.16(b)). b. ☐ (<i>sent to the International Bureau only</i>) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in the form of an Annex C/ST.25 text file, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3ter of Annex C of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned conclusion under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 06.04.2015		Date of completion of this report 30.09.2015	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Smeets, Dieter Telephone No. +49 89 2399-7492	



Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a) and (b))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on (*replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report*):

Description, Pages

1-37 as originally filed

Claims, Numbers

1-20 filed with telefax on 14-08-2015

Drawings, Sheets

1/5-5/5 as originally filed

- ☐ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.
3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
4. ☒ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):
- ☐ the description, pages
 - ☒ the claims, Nos. 1, 5, 20
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
5. ☐ This report has been established:
- ☐ taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.1(d-bis) and 70.2(e)).
 - ☐ without taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91(Rules 66.4bis and 70.2(e)).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/IB2014/061982

6. ☒ With regard to top-up searches (Rules 66.1 *ter* and 70.2(f)):
- ☒ A top-up search was carried out by this Authority on 02.09.2015 (all discovered documents are listed in the Supplemental Box Relating to Top-up Search).
 - ☐ Additional relevant documents have been discovered during the top-up search.
 - ☐ No top-up search was carried out by this Authority because it would serve no useful purpose.
7. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) has/have been received and taken into account in establishing this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

* If item 4 applies, some or all of those sheets may be marked "superseded".

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-16, 19, 20</u>
	No: Claims	<u>17, 18</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-16, 19, 20</u>
	No: Claims	<u>17, 18</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-20</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item I

Basis of the report

The amendments filed with the letter dated 14.08.2015 introduce subject-matter which extends beyond the content of the application as filed, contrary to Article 34(2)(b) PCT. Independent claims 1, 5 and 20 are concerned for the following reasons:

Said claims are based on the enzyme-blend compositions "B" to "G" of Table 2 (pages 18 and 19 of the description). In composition "G" the excipient present in an amount of 4.9% consists of maltodextrin or fumed silica. This is not reflected by claims 1, 5 or 20.

This report is made as if this unallowable generalisation with respect to composition "G" was not made.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1 Lack of clarity (Art. 6 PCT)

The following important observations are made with respect to the clarity and the interpretation of the claims:

1.1 The feature in claim 2 "wherein the composition is a synergistic composition" merely characterizes the subject-matter by the result-to-be achieved and therefore renders the subject-matter of said claim unclear. Only specifically disclosed combinations of particular enzymes showing a synergistic effect are considered to meet the requirements of clarity.

1.2 The feature in claim 4 "wherein the composition is employed for clarifying sugar juice" merely defined the intended use, without adding further distinguishing product features to the composition. Hence, the subject-matter of said claim is redundant.

2 Reference is made to the following documents:

D1 Marianne Mckee ET AL: "Effect of Commercial Enzymes on Color and Total Polysaccharide Content in Sugarcane and Sugarbeet Juice"
In: "Industrial Application of Enzymes on Carbohydrate-Based Material", 30 August 2007 (2007-08-30), American Chemical

Society, Washington, DC, XP055138617,
ISBN: 978-0-84-122096-6
vol. 972, pages 88-100, DOI: 10.1021/bk-2007-0972.ch007,

- D2 CN 1 936 024 A (TANG MING [CN] MING TANG [CN]) 28 March 2007 (2007-03-28)
- D3 US 6 156 563 A (KAMPEN WILLEM H [US]) 5 December 2000 (2000-12-05)
- D4 WO 2006/063467 A1 (LOGEN ENERGY CORP [CA]; FOODY BRIAN [CA]; RAHME ZIYAD [CA]; TOLAN JEFF) 22 June 2006 (2006-06-22)

3 Lack of novelty (Art. 33(1) and (2) PCT)

- 3.1 Claims 17 and 18 are directed to a clarified sugar juice obtained (=obtainable) by the process of claim 5. It is pointed out that this process does not imply any distinguishing product features on the sugar juice as said juice does not necessarily contain the specific enzyme blends anymore. The process does not exclude that these enzymes were filtered out or denatured. The content of the raw juice is also not known, hence nothing can be said about the composition of the final, clarified juice except for the fact that it contains sugar and that it is clarified to an unknown extent. The addition of other enzymes is also not excluded in said process.

Hence, any sugar juice, for example the juices described in D1 (page 97 - page 99; tables), are considered novelty destroying for the subject-matter of claims 17 and 18.

- 3.2 The enzyme blend compositions disclosed in independent claims 1, 5 and 20 are not disclosed in any of the available prior art documents.

Hence, claims 1, 5 and 20 are novel.

4 Inventive step (Art. 33(1) and (3) PCT)

- 4.1 The question whether claims 17 and 18 involve an inventive step is only of relevance once novelty of these claims has been established.

- 4.2 D1 is considered closest prior art for the subject-matter of independent claims 1, 5 and 20. Said document discloses that the enzyme functionalities cellulase, xylanase and hemicellulase significantly reduce color in raw sugar juices. Combinations of cellulase, xylanase and hemicellulase are not disclosed in D1.
- 4.3 The subject-matter of the independent claims 1, 5 and 20 differs from D1 in that particular blends of enzymes are disclosed comprising at least cellulase, xylanase and hemicellulase in specific amounts.
- 4.4 The objective technical problem can be formulated as providing novel enzyme blend compositions able to remove colour from raw sugar juices.
- 4.5 As the combination of cellulase, xylanase and hemicellulase is not suggested in D1, the subject-matter of claims 1, 5 and 20 is not derivable from D1.
Hence, the subject-matter of these claims is considered to involve an inventive step.
- 4.6 Claims 2-4, 6-16, 19 are dependent on claims 1 and 5 and as such also meet the requirements of the PCT with respect to novelty and inventive step.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

See Re Item V.



Intellectual Property Attorneys

August 14, 2015

Smets, Dieter
 Authorized Officer
 EUROPEAN PATENT OFFICE
 D-80298 MUNICH

[**VIA FAX**]

Tel: +49 89 2399 - 0
 Fax: +49 89 2399 - 4465
 E-mail:

**Re: RESPONSE TO FURTHER WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
 PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY**
 International PCT Application No. PCT/IB2014/061982
 International Filing Date: June 05, 2014
 Claiming priority of Indian Patent Application No. 2496/CHE/2013; dated June
 06, 2013
 Title: A COMPOSITION, PROCESS AND A KIT FOR SUGAR PROCESSING
 Applicant: RICHCORE LIFESCIENCES PVT. LTD.
 K&S Ref.: PCT1434/SD/aa

Dear Sir,

We write with reference to the aforementioned PCT Application, wherein we would like to submit the response towards the objections raised in the Written Opinion issued by the IPEA on **June 17, 2015**. In view of the objections raised in the Written Opinion, the claims have been amended as follows:

CLAIMS (amended under Article 34)	CLAIMS AS CURRENTLY AMENDED
Claim 1	Amended
Claims 2	Unchanged
Claim 3	Amended
Claim 4	Unchanged
Claim 5-7	Deleted
Claim 8-23	Amended and Renumbered

The Applicant believes that the response is timely filed and requests the Authorized Officer to consider the same and issue a Favorable IPRP for this matter.

K & S PARTNERS

4121/B, 6th Cross, 19A Main, HAL II Stage (Extension), Bangalore 560038, India

Tel: + 91 (80) 40427900 Fax: +91 (80) 4042 7901

E-Mail: bangalore@knspartners.com; Website: www.knspartners.com

Also at Gurgaon | Hyderabad | Mumbai | New Delhi

In case of any query, the Authorized Officer is respectfully requested to contact the below mentioned signatory.

With Regards,

Yours Sincerely,



Sindhu Vijayakrishnan
IN/PA-1726

Agent for the Applicant

K&S PARTNERS

Intellectual Property Attorneys

4121/B, 6th Cross, 19A Main,

HAL II Stage (Extension),

Bangalore 560 038,

Karnataka, INDIA

Telephone No: **+91 8040427938**

Fax No: **+91 8040427901**

E-mail: Sindhu@knspartners.com

Enclosures:

- **Response towards further Written Opinion of the International Preliminary Examining Authority (1 copy);**
- **Marked up version of amended claims (1 copy); ; and**
- **Clear versions of amended claims (2 copies).**

BEFORE THE EUROPEAN PATENT OFFICE

Re: International PCT Application No. PCT/IB2014/061982
Filed on: June 5, 2014
Claiming priority of Indian Patent Application No. 2496/CHE/2013 dated June 6, 2013.
Title: A COMPOSITION, PROCESS AND A KIT FOR SUGAR PROCESSING
Applicant: RICHCORE LIFESCIENCES PCT. LTD.
K&S Ref.: PCT1434/SD

**"RESPONSE TO FURTHER WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY"**

The Authorized Officer, in the present Written Opinion has retained the objections on novelty and inventiveness with respect to claims 1-23 of the present invention. The Authorized Officer has raised additional objections related to amendments. The Applicant submits an amended claim set (claims 1-20) and provides the following response:

Re Item I:

The Authorized Officer conveys that the amendment filed with the letter received on April 14, 2015 with regard to the disclaimer present in the independent claims 1, 8, 22 and 23, extends beyond the content of the application as-filed, contrary to Article 34 (2)(b) PCT. The Authorized Officer states that the specific combination of xylanase and cellulase is not directly and unambiguously disclosed in the application as originally filed and hence, the disclaimer is a so-called undisclosed disclaimer which is not allowable in the present case.

RESPONSE: The Applicant would like to state that the as-filed claims 1, 8, 22 and 23 (i.e. the presently amended claims 1, 5, 19 and 20) have been amended in order to address the aforementioned objection. The disclaimer in the said claims has been removed and specific enzyme blends are indicated in the amended claims 1, 5, 19 and 20. The Applicant would like to inform the Authorized Officer that support for said amended claims 1, 5, 19 and 20 is derived from 'Table 2' on page 18 of the specification, which discloses the specific enzyme blends of the present disclosure along with their constituents and specific concentrations. 'Examples 2-8' of the present disclosure also provide enablement for the enzyme blends as disclosed in Table 2 on page 18 of the present specification. Further, the support for 'excipient' is derived from the original claims 5-7 of the present disclosure (which are now

deleted). The Applicant believes that the present amendments are sufficiently supported by the specification and do not go beyond the content of the application as-filed. Therefore, Authorized Officer is requested to take the amended claims 1, 5, 19 and 20 on record and accordingly withdraw the said objection.

Re Item V:

1. Lack of clarity (Article 6 PCT):

1.1. The Authorized Officer opines that the claim 1, which is directed to a composition *comprising* an enzyme blend, does not exclude the presence of other components including enzymes not present in the group as listed in claim 1. The same observation is stated to be of relevance for the subject-matter of claims 8, 22 and 23.

RESPONSE: The Applicant would like to state that the as-filed claim 1 has been amended to recite "A composition 'consisting' of an enzyme blend". By this amendment, the Applicant believes that the presence of other enzymes which are not listed in claim 1 are excluded. Similarly, the claims 8, 22 and 23 (i.e. the presently amended claims 5, 19 and 20) have been amended in such a manner that the presence of other enzymes are excluded. Hence, the Applicant respectfully requests the Authorized Officer to consider the amended claims 1, 5, 19 and 20 and kindly withdraw the clarity objection raised in this regard.

1.2. The Authorized Officer states that the features following the expression "optionally" are not taken into consideration for assessment of novelty and inventive step and thereby the subject-matter of claims 5-7, 12, 13, 15 and 16 is redundant.

RESPONSE: The Applicant has deleted as-filed claims 5-7 of the present disclosure. The specific excipients are now indicated in the amended claim 1. Further, the Applicant believes that the expression "optionally" is not redundant and rather clearly defines the subject-matter/scope of the claims. The respected Authorized Officer is requested to take the amendments on record and withdraw this objection.

1.3. The Authorized Officer is of the opinion that in claim 2, the feature- "wherein the composition is a synergistic composition", renders the subject matter of the said claim unclear since only specifically disclosed combinations of particular enzymes showing a synergistic effect are considered to meet the requirements of clarity.

RESPONSE: Here, the Applicant would like to state that the principle claim 1 has been amended to indicate specific enzyme blends consisting of specific combinations of enzymes at particular concentrations. Since, claim 2 is dependent on claim 1, the Applicant requests the Authorized Officer to kindly withdraw the objection on claim 2 of the present disclosure.

1.4. The Authorized Officer states that the subject matter of claim 4 is redundant as the feature in claim 4- “wherein the composition is employed for clarifying sugar juice” merely defined the intended use, without adding further distinguishing product features to the composition.

RESPONSE: The Applicant would like to state that the aspect of “clarifying sugar juice” as recited in claim 4 of the present invention is an important property/ significant feature of the composition of the present invention and said feature further defines or substantiates the said composition. Therefore, the Applicant requests the Authorized Officer not to consider this feature as an intended use and accordingly withdraw the objection.

2. The following documents have been referred to in the present written opinion:

D1: Marianne Mckee et al.

D2: CN1936024A

D3: US6156563A

D4: WO2006/063467A1

3. Lack of Novelty (Article 33(1) and (2)PCT)

3.1 The citation D1 is considered to anticipate the subject-matter of claims 1-7, 20-22 as D1 discloses various enzyme blends (such as depol 112L, sucrodex and viscozyme) for reducing color in sugarcane juices and the wording of the said claims does not exclude the presence of enzymes not listed in the group.

3.2 Citation D2 is considered to anticipate the subject matter of claims 1-7, 20-22 since the said citation discloses enzyme preparations for refining cane sugar, replacing sulphitation and containing 14-18 wt% amylase, 10-14 wt% pectinase, 8-12 wt% dextranase, 8-12 wt% protease and 16-20 wt% cellulase enzyme.

RESPONSE: Initially, the Applicant would like to re-iterate that the claims 1, 8 and 22 have been amended to recite specific enzyme blends, which exclude the presence of enzymes not listed in the group. On the other hand, the enzyme blends disclosed in citation D1 (such as sucrodex and viscozyme) consist of additional enzymes such as dextranase, arabanase and pectinase which are not the components of the enzyme blends as disclosed in amended claim 1 of the present disclosure. Further, the enzyme blend depol 112L of citation D1 (that consists of cellulase and xylanase) is not envisaged by amended claim 1 of the present disclosure. Thus, citation D1 does not disclose any of the enzyme blends recited in the amended claims 1, 5 and 19 of the present disclosure (refer 'Table 1' at page 94 of D1 which discloses all the 28 commercial enzymes used in the study). Therefore, the amended claims 1, 5 and 19 are novel in view of citation D1.

Similarly, the enzyme preparations as disclosed in citation D2 contains pectinase, dextranase and protease which are not a part of the enzyme blends recited in the amended claims 1, 5 and 19 of the present disclosure. Further, citation D2 does not disclose any of the enzyme blends of the amended claims 1, 5 and 19 of the present disclosure. Therefore, the amended claims 1, 5 and 19 are novel with respect to citation D2 as well.

The Applicant would like to respectfully state that since the amended claims 1 and 5 are novel with respect to the citations D1 and D2, the current dependent claims 2-4 and 17-18 should also be considered novel in view of citations D1 and D2.

3.3 The Authorized Officer considers citation D3 to be relevant for the subject- matter of claims 1-22 since D3 discloses a process for clarifying sugar cane juice by addition of enzymes as a blend at a treatment temperature of 37°C and involving a step of adding lime to raise the pH.

3.4 The Authorized Officer considers citation D4 to be relevant for the subject- matter of claims 1-23 as D4 discloses enzymatic hydrolysis of cellulose using an enzyme blend comprising a plurality of cellulases and beta-glucosidase, discloses a kit comprising cellulases and a flocculent and also discloses the introduction of pH regulators.

RESPONSE: The Applicant would like to state that although the citation D3 discloses a process for clarifying sugar cane juice by addition of enzymes as a blend, the enzyme blend

of D3 consists of phytic acid and acid phosphatase which are not included in the enzyme blends of amended claims 1, 5, 19 and 20 of the present disclosure. In other words, citation D3 does not disclose the enzyme blends envisaged in amended claims 1, 5, 19 and 20.

Similarly, the enzyme composition as claimed in claim 50 of citation D4 comprises cellulase enzymes and one or more than one flocculent for hydrolysing cellulose to glucose, cellobiose, glucose oligomers, or a combination thereof. This enzyme composition is not envisaged by the enzyme blends of amended claims 1, 5, 19 and 20 of the present disclosure and hence citation D4 is not relevant from novelty perspective.

Lastly, the Applicant would like to respectfully state that the amended claims 1, 5, 19 and 20 are indeed novel with respect to citations D3 and D4. Further, the respective dependent claims 2-4 and 6-18 should also be considered novel accordingly with respect to citations D3 and D4.

Hence, the Respected Authorized Officer is requested to consider the aforementioned clarifications and kindly withdraw the novelty objections raised with respect to citations D3-D4.

4. Lack of inventive step (Article 33(1) and (3) PCT):

The Authorized Officer has conveyed that the question of whether the application involves an inventive step is only of relevance once the requirements of clarity (Article 6 PCT) are met and novelty of the independent claims has been established.

Also, the Authorized Officer is of the opinion that the essential teachings of the present application are already known from the prior art.

Further, the Authorized Officer has conveyed that none of the independent claims is limited to a combination of hemicellulase, cellulase and xylanase. Furthermore, no surprising effects appear to be associated with the use of particular holding times and the use of excipients.

RESPONSE: At the outset, the Applicant would like to state that the presently amended independent claims 1, 5, 19 and 20 have been amended to indicate specific enzyme blends, none of which are disclosed in the cited documents D1-D4, as explained above.

Further, citations D1-D4, neither individually nor in combination provide motivation to a skilled person to arrive at the specific enzyme blends as disclosed in amended claims. Citations D1-D4 disclose certain additional enzymes such as dextranase, pectinase, protease, arabanase etc., which are not components of the enzyme blends of the present claims. Therefore, upon referring to D1-D4, a person skilled in the art would NOT be motivated to exclude or disregard enzymes such as dextranase, protease and pectinase and randomly arrive at such specific enzyme blends which are envisaged by the amended claim 1. This is due the fact that the use of specific enzyme blends containing enzymes such as amylase, pectinase, dextranase, protease etc. are taught by citations D1-D4, and a skilled person cannot move away from the said teachings since citations D1-D4 does not hint or teach that these enzymes can be replaced, added or removed from the said enzyme blend.

The Applicant would like to highlight the inventive aspects of the instant claims in detail vis-à-vis the citations D1-D4 as follows:

With respect to citation D1:

Citation D1 explains the effect of 28 commercially available enzymes on color and total polysaccharide content in sugarcane juice. 'Table 1' on page 94 of citation D1 discloses the 28 commercial enzymes used in the study. The following are few key observations from this study:

With regard to samples used for treating sugarcane juice:

1. *Hemicellulase* was found to remove the most color at 18% (with reference to page 95, 2nd para).
2. Some enzymes/enzyme mixtures containing *cellulase* and *xylanase* (e.g. DEPOL 40L, DEPOL 670L etc.) were found to be disadvantageous in sugar processing owing to the fact that they destroyed the sucrose molecule (with reference to page 96, last para) and thus were not suitable for use in sugar processing.
3. Enzymes *Hemicellulase* and *xylanase* were found to be disadvantageous in the sense that they increased polysaccharide content in juice (with reference to page 97, 2nd para).

Thus, it is apparent that D1 mentions certain enzymes to show inferior properties/results such as- (A) hemicellulase, xylanase are stated to increase polysaccharide content of the clarified

juice [with reference to page no. 98, 2nd para]; (B) DEPOL 40L (a mixture of cellulase, xylanase, pectinase), DEPOL 670 (a mixture of cellulase, xylanase, pectinase, ferulic acid esterase) are stated to degrade/destroy sucrose [with reference to page no. 96, last para] which leads to the reduction in % purity of the clarified sugarcane juice. In view of the same, the Applicant would like to state that a skilled person referring to the teachings of citation D1 would be *discouraged* to employ such enzymes in a composition for clarifying sugar juice. In other words, citation D1 teaches away from the subject-matter of present claims. Further, the teachings of D1 would discourage a person skilled in the art to formulate enzyme blends containing any or all of the enzymes such as hemicellulase, xylanase, and cellulase since it is shown in citation D1 that combination/use of such enzymes have inferior effects such as sucrose degradation and polysaccharide increase. Therefore, a skilled person would not be motivated to arrive at compositions of the amended claim 1 which comprises enzyme blends mandatorily containing enzymes hemicellulase, xylanase, and cellulase for clarifying sugar juice. In other words, the enzyme blends of the amended claim 1 include the enzymes- hemicellulase, xylanase and cellulase (i.e. those enzymes stated to be disadvantageous in D1) wherein the enzyme blends envisaged under amended claim 1, bring about enhanced clarification of sugar juice.

Furthermore, the Applicant would like present the following data/results [Table A] achieved for ICUMSA (a standard parameter for analysis of sugar), percentage of color reduction, absorbance at 720 nm (which corresponds to turbidity) and percentage of purity for compositions comprising enzyme blends B to G as envisaged by the amended claims:

Table A: This is an extension of 'Table 3' of the as-filed application (page no. 23, Example 3) showing results of ICUMSA, percentage of color reduction, absorbance at 720 nm and percentage of purity for blends B to G

Parameters	Sulphur treated juice			Enzyme Treated Juice			
		blend B (xylanase, cellulase and hemicellulase)	blend C (xylanase, cellulase, hemicellulase and β glucanase)	blend D (xylanase, cellulase, hemicellulase, alpha amylase and β glucanase)	blend E (xylanase, cellulase, hemicellulase, alpha amylase and β glucanase)	blend F (xylanase, cellulase, hemicellulose, alpha amylase and β glucanase, galactosidase, glucose oxidase)	blend G (xylanase, cellulase, hemicellulase, alpha amylase and β glucanase, galactosidase, glucose oxidase, ascorbic acid, excipients)
Brix	0.2	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Initial ICUMSA (colour)			28758				
Final ICUMSA	14466	11676	11877	11446	10123	9921	9561
% Color Reduction	47.3 %	59.4 %	58.7 %	60.2 %	64.8 %	65.5 %	66.7 %
Absorbance 720 nm (Turbidity)	0.478	0.317	0.335	0.310	0.294	0.288	0.287
Purity (%)	77.27	76.12	77.05	76.58	77.43	77.58	78.32

Thus, with reference to the above table A, the Applicant would like to state that **better values of color reduction** in the clarified juice is achieved by the compositions of the present invention (amended claim 1) vis-à-vis the enzymes/enzyme blends disclosed in citation D1 (which show a maximum color reduction of 18% in sugarcane juice; see page no. 95 and Figure 2). Further, the above table A also indicates that desirable values of final ICUMSA,

low turbidity and high purity of the clarified sugar juice is achieved when enzyme blends recited under amended claim 1 are employed for clarifying sugar juice.

The Applicant here would also like to emphasize that the enzyme blends in the present invention are employed at a lower concentration when compared to the concentrations employed in citation D1. In particular, the 'dosage' of the composition of the present invention comprising enzyme blend is in the range of '1 ppm to 50 ppm' per 100 ml of juice [refer Example 4 on page nos. 23-31 of the as-filed specification]. On the other hand, according to *page 88 (abstract) and page 93 of citation D1*, '500 ppm' of individual enzyme/enzyme mixture was added to 100 mL of sugarcane juice. Thus, use of low enzyme concentration and yet achieving better results of color reduction in sugar clarification is another significant advantage vis-à-vis citation D1.

In view of the aforementioned teachings of citation D1 and also considering the aforementioned results of colour reduction achieved in the clarified juice by employing the composition of the present disclosure, the Applicant would like to respectfully state that the amended composition claim 1 and remaining claims directly or indirectly referring to said amended claim 1 (amended claims 2-20) of the present invention are indeed inventive.

With respect to citation D2:

Citation D2 relates to an enzyme preparation for cane sugar, wherein the enzyme preparation contains 14-18wt% amylase, 10-14wt% pectinase, 8-12wt% dextranase, 8-12wt% protease and 16-20wt% cellulase enzyme. The said enzyme blend of D2 is not envisaged by the amended claim 1 of the present invention and moreover, enzymes such as dextranase, protease and pectinase are not at all employed by the present invention/amended claim 1. Therefore, upon referring to D2 either alone or in combination with D1, a person skilled in the art would not be motivated to exclude or disregard enzymes such as dextranase, protease and pectinase which are mandatorily employed in D2 and randomly arrive at such enzyme blends which are envisaged by the amended claim 1. This is due the fact that D2 teaches the specific enzyme blend containing amylase, pectinase, dextranase, protease and cellulase enzyme, and a skilled person cannot move away from said teachings of D2, especially when citation D2 does not hint or teach that few enzymes can be replaced, added or removed from the said enzyme blend.

Further, according to page number 17 of citation D2, the sugar color value can be decreased by 20 to 30% upon adding the enzyme preparation to sugar juice whereas according to as-filed specification of the present invention and Table A presented above, the enzyme blends result in better reduction in color when compared with untreated juice.

Therefore, in view of the specific enzyme blends envisaged in the amended claim 1 of the present disclosure which is not taught in citation D2, the achieved percentage of colour reduction in the clarified juice, the Applicant would like to state that the amended claims 1-20 of the present invention are inventive with respect to citation D2.

Additionally, the Applicant would like to also convey that when the combined teachings of citations D1 and D2 are considered, citation D1 clearly evidences the limitations of certain enzymes when used alone or in combination with other known enzymes. Accordingly, a person skilled in the art cannot derive motivation to modify the composition of D2 in view of D1 to arrive at composition as recited in the amended claim 1. Further, neither citation D1 nor D2 teach or suggest the process for clarifying sugar juice as disclosed in the amended claim 5, a process for obtaining the composition as disclosed in the amended claim 19 or the kit as disclosed in the amended claim 20 which all directly refer to the composition of amended claim 1 of the present invention.

Based on the aforementioned points, the Applicant would like to conclude that amended claims 1, 5, 19 and 20 and the corresponding dependent claims of the present inventive are inventive with respect to citations D1 and D2 when considered alone or in conjunction.

With respect to citation D3:

The citation D3 describes a method for clarifying sugarcane juice by treating the phytic acid in sugar cane juice with phytase and acid phosphatase to convert the phytic acid to inositol and inorganic phosphate (with reference to the abstract). Further, it is stated that the extra phosphate released by this process is available to react with milk of lime, thus improving subsequent flocculation and consequent clarification.

According to columns 2 and 3 of the citation D3, it is understood that an unrecognized and untapped source of phosphate has been identified that is naturally present in sugar cane juice and citation D3 provides for a method to free that phosphate for clarification. In particular, it

is stated that the phytic acid in sugar cane juice is treated with phytase and acid phosphatase, which converts the phytic acid to inositol and inorganic phosphate, which thereby improves the clarification of sugar juice.

On the other hand, the objective of the present invention/claims is to provide for an enzyme blend composition for clarifying sugar juice *per se*, wherein said enzyme blend substantially reduces the color in the clarified sugar juice and does not aim at a process of converting phytic acid in sugar juice to inositol and inorganic phosphate as taught by citation D3 (via addition of phytase and acid phosphatase). Therefore, the primary objective and the process of the present invention differs from that of citation D3. Further, citation D3 does not teach or disclose any of the enzymes/non-enzyme component or the enzyme blend of the composition as recited in amended claim 1 nor discloses the process for clarifying sugar juice as claimed in the amended claim 5, a process for obtaining a composition as claimed in claim 19 or kit as disclosed in the amended claim 20 of the present invention.

Therefore, the Applicant would like to respectfully state that the amended claims 1-20 of the present invention are inventive with respect to citation D3. The Authorized Officer is requested to take the aforementioned clarifications on record and kindly withdraw the inventiveness objections in view of citation D3.

With respect to citation D4:

Citation D4 discloses an enzyme composition comprising cellulase enzymes (i.e. multienzyme mixture comprising exocellobiohydrolases, endoglucanases and beta glucosidases) and one or more flocculent for hydrolysing cellulose to produce a hydrolysis product from cellulosic feedstock. Thus, D4 does not teach or suggest an enzyme blend composition as claimed in the amended claim 1, a corresponding kit comprising the same as claimed in the amended claim 20, process for clarifying sugar juice as claimed in the amended claim 5 or process for obtaining the composition as claimed in the amended claim 19 of present invention. Hence, the amended claims 1-20 of the present invention are inventive with respect to citation D4.

Additionally, even if a person skilled in art considers citations D3 and/or D4 in conjunction with citations D1 and D2, he will not be able to deduce the enzyme blend composition of the present invention as citation D1 appears to discourage a skilled person from employing

certain enzymes (for e.g. hemicellulase, xylanase, cellulase) due to the associated drawbacks in clarifying sugar juice, and citation D2 does not teach all the constituents of the enzyme blend composition of the amended claim 1.

Thus, in view of the aforementioned differences and features of the present invention and said citations, the Applicant would like to respectfully state that the inventiveness of present invention/claims is not compromised by the disclosures of citations D1-D4 either when considered individually or in any combination. The learned Authorized Officer is requested to consider the aforementioned clarifications and accordingly withdraw the inventiveness objection levied on the amended claims 1-20 of the present invention.

In view of the above explanation to the objections along with claim amendments, the Applicant requests the learned Authorized Officer to withdraw the objections and issue a favourable IPRP for the present invention.

IN/PA-1726

AMENDED CLAIMS- CLEAR VERSION**We claim:**

1. A composition consisting of an enzyme blend, optionally along with excipient, wherein the enzyme blend is selected from a group consisting of (a) xylanase at a concentration of about 40% (w/w), cellulase at a concentration of about 40% (w/w) and hemicellulase at a concentration of about 20% (w/w), (b) xylanase at a concentration of about 40% (w/w), cellulase at a concentration of about 40% (w/w), hemicellulase at a concentration of about 10% (w/w) and glucanase at a concentration of 10% (w/w), (c) xylanase at a concentration of about 30% (w/w), cellulase at a concentration of about 30% (w/w), hemicellulase at a concentration of about 20% (w/w), amylase at a concentration of about 10% (w/w) and glucanase at a concentration of about 10% (w/w), (d) xylanase at a concentration of about 30% (w/w), cellulase at a concentration of about 30% (w/w), hemicellulase at a concentration of about 15% (w/w), amylase at a concentration of about 20% (w/w) and glucanase at a concentration of about 5% (w/w), (e) xylanase at a concentration of about 25% (w/w), cellulase at a concentration of about 25% (w/w), hemicellulase at a concentration of about 15% (w/w), amylase at a concentration of about 10% (w/w), glucanase at a concentration of about 15% (w/w), galactosidase at a concentration of about 5% (w/w) and glucose oxidase at a concentration of about 5% (w/w), and (f) xylanase at a concentration of about 25% (w/w), cellulase at a concentration of about 20% (w/w), hemicellulase at a concentration of about 15% (w/w), amylase at a concentration of about 10% (w/w), glucanase at a concentration of about 15% (w/w), galactosidase at a concentration of about 5% (w/w), glucose oxidase at a concentration of about 5% (w/w), ascorbic acid at a concentration of about 0.1% (w/w) and excipient at a concentration of about 4.9% (w/w); and wherein the excipient is selected from a group consisting of fumed silica, bentonite, talc, sodium chloride, sucrose, maltodextrin, trehalose, lactose, arabinose, cellulose and anionic flocculent, or any combination thereof.
2. The composition as claimed in claim 1, wherein the composition is a synergistic composition.
3. The composition as claimed in claim 1, wherein the amylase is selected from a group consisting of α -amylase, β -amylase and γ -amylase; the xylanase is selected from a group consisting of exo-xylanase and endo-xylanase; the

IN/PA-1726

AMENDED CLAIMS- CLEAR VERSION

cellulase is selected from a group consisting of exo-cellulase, endo-cellulase and cellobiase;; the glucanase is selected from a group consisting of α -glucanase, β -glucanase, xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanase, xyloglucan-specific exo-beta-1,4-glucanase and pullulanase; and the galactosidase is selected from a group consisting of α -galactosidase and β -galactosidase.

4. The composition as claimed in claim 1, wherein the composition is employed for clarifying sugar juice or obtaining chemical free sugar, and wherein the sugar juice is obtained from a source selected from a group consisting of sugarcane, sugarbeet, raw sugar, and other substrate used for sugar processing or any combination thereof.

5. A process for clarifying sugar juice, said process comprising acts of:

i) mixing the juice with an enzyme blend, wherein the enzyme blend is selected from a group consisting of: (a) xylanase at a concentration of about 40% (w/w), cellulase at a concentration of about 40% (w/w) and hemicellulase at a concentration of about 20% (w/w), (b) xylanase at a concentration of about 40% (w/w), cellulase at a concentration of about 40% (w/w), hemicellulase at a concentration of about 10% (w/w) and glucanase at a concentration of 10% (w/w), (c) xylanase at a concentration of about 30% (w/w), cellulase at a concentration of about 30% (w/w), hemicellulase at a concentration of about 20% (w/w), amylase at a concentration of about 10% (w/w) and glucanase at a concentration of about 10% (w/w), (d) xylanase at a concentration of about 30% (w/w), cellulase at a concentration of about 30% (w/w), hemicellulase at a concentration of about 15% (w/w), amylase at a concentration of about 20% (w/w) and glucanase at a concentration of about 5% (w/w), (e) xylanase at a concentration of about 25% (w/w), cellulase at a concentration of about 25% (w/w), hemicellulase at a concentration of about 15% (w/w), amylase at a concentration of about 10% (w/w), glucanase at a concentration of about 15% (w/w), galactosidase at a concentration of about 5% (w/w) and glucose oxidase at a concentration of about 5% (w/w), and (f) xylanase at a concentration of about 25% (w/w), cellulase at a concentration of about 20% (w/w), hemicellulase at a

IN/PA-1726

AMENDED CLAIMS- CLEAR VERSION

- concentration of about 15% (w/w), amylase at a concentration of about 10% (w/w), glucanase at a concentration of 15% (w/w), galactosidase at a concentration of about 5% (w/w), glucose oxidase at a concentration of about 5% (w/w), ascorbic acid at a concentration of about 0.1% (w/w) and excipient at a concentration of about 4.9% (w/w); and wherein the excipient is selected from a group consisting of fumed silica, bentonite, talc, sodium chloride, sucrose, maltodextrin, trehalose, lactose, arabinose, cellulose and anionic flocculent, or any combination thereof, to obtain a mixture;
- ii) optionally holding-up followed by cooling the mixture; and
- iii) neutralizing the mixture of step (i) or step (ii) by adding a pH regulator, followed by re-holding-up and optional re-cooling, followed by optional adding of excipient or filtering or both, to obtain the clarified sugar juice.
6. The process as claimed in claim 5, wherein the sugar juice is obtained from a source selected from a group consisting of sugarcane, sugarbeet, raw sugar, and other substrate used for sugar processing or any combination thereof.
7. The process as claimed in claim 5, wherein the amylase is selected from a group consisting of α -amylase, β -amylase and γ -amylase ; the xylanase is selected from a group consisting of exo-xylanase and endo-xylanase; the cellulase is selected from a group consisting of exo-cellulase, endo-cellulase and cellobiase ; the glucanase is selected from a group consisting of α -glucanase, β -glucanase, xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanase, xyloglucan-specific exo-beta-1,4-glucanase and pullulanase; and the galactosidase is selected from a group consisting of α -galactosidase and β -galactosidase.
8. The process as claimed in claim 5, wherein the mixing is carried out by adding the enzyme blend to the sugar juice having a temperature of 35°C to 45°C or wherein the mixing is carried out by adding the enzyme blend to the sugar juice to obtain a mixture followed by boiling the mixture to a temperature of 65°C to 75°C.

IN/PA-1726

AMENDED CLAIMS- CLEAR VERSION

9. The process as claimed in claim 5, wherein the holding-up of step (ii) is at a temperature ranging from 50°C to 80°C for a time period ranging from 5 minutes to 15 minutes.
10. The process as claimed in claim 5, wherein the cooling is at a temperature ranging from 25°C to 30°C.
11. The process as claimed in claim 5, wherein the neutralizing is carried out by addition of pH regulator selected from a group consisting of calcium oxide (lime), calcium hydroxide (milk of lime), orthophosphoric acid and inorganic calcium compounds or any combination thereof.
12. The process as claimed in claim 5, wherein the re-holding-up of step (iii) is for a time period ranging from 20 minutes to 90 minutes, at a temperature ranging from 90°C to 110°C or is for a time period ranging from 10 minutes to 20 minutes, at a temperature ranging from 90°C to 110°C.
13. The process as claimed in claim 5, wherein the filtering is carried out by method selected from a group consisting of membrane filtration, filter press and settling or any combination thereof.
14. The process as claimed in claim 5, wherein the clarified sugar juice can be further processed to obtain clarified sugar.
15. The process as claimed in claim 5, wherein the process comprises acts of:
- a. adding the enzyme blend to the sugar juice having a temperature of 30°C to 45°C to obtain a mixture;
 - b. optionally holding-up at a temperature ranging from 50°C to 80°C for a time period ranging from 5 minutes to 15 minutes followed by cooling the mixture at a temperature ranging from 25°C to 30°C; and
 - c. neutralizing the mixture of step (a) or step (b) by adding a pH regulator, followed by re-holding-up for a time period ranging from 20 minutes to 90 minutes, at a temperature ranging from 90°C to 110°C and optional re-cooling, followed by optional adding of excipient or filtering or both, to obtain the clarified sugar juice.
16. The process as claimed in claim 5, wherein the process comprises acts of:
- a. adding the enzyme blend to the sugar juice to obtain a mixture followed by boiling the mixture to a temperature of 65°C to 75°C;

IN/PA-1726

AMENDED CLAIMS- CLEAR VERSION

- b. optionally holding-up at a temperature ranging from 50°C to 80°C for a time period ranging from 5 minutes to 15 minutes followed by cooling the mixture at a temperature ranging from 25°C to 30°C; and
- c. neutralizing the mixture of step (a) or step (b) by adding a pH regulator, followed by re-holding-up for a time period ranging from 10minutes to 20minutes, at a temperature ranging from 90°C to 110°C and optional re-cooling, followed by optional adding of excipient or filtering or both, to obtain the clarified sugar juice.
17. Clarified sugar juice obtained by the process as claimed in claim 5.
18. The clarified sugar juice as claimed in claim 17, wherein the juice can be further processed to obtain clarified sugar.
19. A process for obtaining a composition consisting of an enzyme blend optionally along with excipient as claimed in claim 1, said process comprising act of combining components of the enzyme blend to obtain the composition .
20. A kit for clarifying sugar juice or for obtaining clarified sugar, said kit consisting of a composition consisting of an enzyme blend, optionally along with excipient, wherein said enzyme blend is selected from a group consisting of: (a) xylanase at a concentration of about 40% (w/w), cellulase at a concentration of about 40% (w/w) and hemicellulase at a concentration of about 20% (w/w), (b) xylanase at a concentration of about 40% (w/w), cellulase at a concentration of about 40% (w/w), hemicellulase at a concentration of about 10% (w/w) and glucanase at a concentration of 10% (w/w), (c) xylanase at a concentration of about 30% (w/w), cellulase at a concentration of about 30% (w/w), hemicellulase at a concentration of about 20% (w/w), amylase at a concentration of about 10% (w/w) and glucanase at a concentration of about 10% (w/w), (d) xylanase at a concentration of about 30% (w/w), cellulase at a concentration of about 30% (w/w), hemicellulase at a concentration of about 15% (w/w), amylase at a concentration of about 20% (w/w) and glucanase at a concentration of about 5% (w/w), (e) xylanase at a concentration of about 25% (w/w), cellulase at a concentration of about 25% (w/w), hemicellulase at a concentration of about 15% (w/w), amylase at a concentration of about 10% (w/w), glucanase at a concentration of about 15% (w/w), galactosidase at a concentration of about 5% (w/w) and glucose oxidase

IN/PA-1726

AMENDED CLAIMS- CLEAR VERSION

at a concentration of about 5% (w/w), and (f) xylanase at a concentration of about 25% (w/w), cellulase at a concentration of about 20% (w/w), hemicellulase at a concentration of about 15% (w/w), amylase at a concentration of about 10% (w/w), glucanase at a concentration of 15% (w/w), galactosidase at a concentration of about 5% (w/w), glucose oxidase at a concentration of about 5% (w/w), ascorbic acid at a concentration of about 0.1% (w/w) and excipient at a concentration of about 4.9% (w/w); and wherein the excipient is selected from a group consisting of fumed silica, bentonite, talc, sodium chloride, sucrose, maltodextrin, trehalose, lactose, arabinose, cellulose and anionic flocculent, or any combination thereof ; a pH regulator selected from a group consisting of calcium oxide (lime), calcium hydroxide (milk of lime), orthophosphoric acid and inorganic calcium compounds or any combination thereof; and an instruction manual.

REIVINDICACIONES MODIFICADAS
PARA REALIZAR EL EXAMEN DE
PATENTABILIDAD

Reivindicamos:

1. Una composición de una mezcla de enzimas, opcionalmente junto con excipiente, en donde la mezcla de enzimas se selecciona de un grupo que consiste de (a) xilanasas en una concentración de aproximadamente 40% (p/p), la celulasa en una
5 concentración de aproximadamente 40% (p/p) y la hemicelulasa en una concentración de aproximadamente 20% (p/p), (b) la xilanasas en una concentración de aproximadamente 40% (p/p), la celulasa en una concentración de aproximadamente 40% (p/p), la hemicelulasa en una concentración de aproximadamente 10% (p/p) y la glucanasa en una concentración de 10% (p/p), (c)
10 la xilanasas en una concentración de aproximadamente 30% (p/p), la celulasa en una concentración de aproximadamente 30% (p/p), la hemicelulasa en una concentración de aproximadamente el 20% (p/p), la amilasa en una concentración de aproximadamente 10% (p/p) y la glucanasa en una concentración de aproximadamente 10% (p/p), (d) la xilanasas en una concentración de
15 aproximadamente 30% (p/p), la celulasa en una concentración de aproximadamente 30% (p/p), la hemicelulasa en una concentración de aproximadamente el 15% (p/p), la amilasa en una concentración de aproximadamente 20% (p/p) y la glucanasa en una concentración de alrededor de 5% (p/p), (e) la xilanasas en una concentración de aproximadamente 25% (p/p), la
20 celulasa en una concentración de aproximadamente 25% (p/p), la hemicelulasa en una concentración de aproximadamente el 15% (p/p), la amilasa en una concentración de aproximadamente 10% (p/p), la glucanasa en una concentración de aproximadamente el 15% (p/p), la galactosidasa en una concentración de aproximadamente 5% (p/p) y la glucosa oxidasa en una concentración de alrededor de 5% (p/p), y (f) la xilanasas en una concentración de aproximadamente 25%
25 (p/p), la celulasa en una concentración de aproximadamente el 20% (p/p), la hemicelulasa en una concentración de aproximadamente el 15% (p/p), la amilasa en una concentración de aproximadamente 10% (p/p), la glucanasa en una concentración del 15% (p/p), la galactosidasa en una concentración de aproximadamente 5% (p/p), la glucosa oxidasa en una concentración de
30 aproximadamente 5% (p/p), ácido ascórbico en una concentración de

aproximadamente 0,1% (p/p) y el excipiente en una concentración de aproximadamente 4,9% (p/p); y en donde el excipiente es seleccionado de un grupo compuesto de sílice pirógena, bentonita, talco, cloruro de sodio, sacarosa, maltodextrina, trehalosa, lactosa, arabinosa, celulosa y floculante aniónicos o cualquier combinación de los mismos .

2. La composición, tal como se reivindica en la Reivindicación 1, en la cual la composición es una composición sinérgica.

3. La composición, tal como se reivindica en la Reivindicación 1, en la cual la amilasa es seleccionada de un grupo compuesto por la α -amilasa, β -amilasa y γ -amilasa; la xilanasa se selecciona de un grupo compuesto de exo-xilanasa y endo-xilanasa; la celulasa es seleccionada de un grupo compuesto de exo-celulasa, endo-celulasa y glucosidasa; la glucanasa es seleccionada de un grupo compuesto de α -glucanasa, β -glucanasa, xiloglucan específico endo-1,4-beta-glucanasa, xiloglucan específico exo-beta-1,4-glucanasa y pululanasa; y la galactosidasa es seleccionada de un grupo compuesto de α -galactosidasa y β -galactosidasa.

4. La composición, tal como se reivindica en la Reivindicación 1, en donde la composición se emplea para clarificar el jugo de azúcar o para la obtención de azúcar sin sustancias químicas, y en donde el jugo de azúcar se obtiene de una fuente seleccionada de un grupo consistente de caña de azúcar, remolacha azucarera, azúcar sin refinar, y otro sustrato utilizado para el procesamiento del azúcar o cualquier combinación de los mismos.

5. Un proceso para clarificar el jugo de azúcar, dicho proceso compuesto por los siguientes pasos:

i. mezclando el jugo con una mezcla de enzimas, en donde la mezcla de enzimas se selecciona de un grupo que consiste de: (a) la xilanasa en una concentración de aproximadamente 40% (p/p), la celulasa en una concentración de aproximadamente 40% (p/p) y la hemicelulasa en una concentración de aproximadamente 20% (p/p), (b) la xilanasa en una concentración de aproximadamente 40% (p/p), la celulasa en una concentración de aproximadamente 40% (p/p), la hemicelulasa en una concentración de aproximadamente 10% (p/p) y la glucanasa en una

concentración de aproximadamente 10% (p/p), (c) la xilanasa en una
concentración de aproximadamente 30% (p/p), la celulasa en una
concentración de aproximadamente 30% (p/p), la hemicelulasa en una
concentración de aproximadamente el 20% (p/p), la amilasa en una
5 concentración de aproximadamente 10% (p/p) y la glucanasa en una
concentración de aproximadamente 10% (p/p), (d) la xilanasa en una
concentración de aproximadamente 30% (p/p), la celulasa en una
concentración de aproximadamente 30% (p/p), la hemicelulasa en una
concentración de aproximadamente el 15% (p/p), la amilasa en una
10 concentración de aproximadamente 20% (p/p) y glucanasa en una
concentración de aproximadamente 5% (p/p), (e) la xilanasa en una
concentración de aproximadamente 25% (p/p), la celulasa en una
concentración de aproximadamente 25% (p/p), la hemicelulasa en una
concentración de aproximadamente el 15% (p/p), la amilasa en una
15 concentración de aproximadamente 10% (p/p), la glucanasa en una
concentración de aproximadamente el 15% (p/p), la galactosidasa en una
concentración de aproximadamente 5% (p/p) y la glucosa oxidasa en una
concentración de aproximadamente 5% (p/p), y f) la xilanasa en una
concentración de aproximadamente 25% (p/p), la celulasa en una
20 concentración de aproximadamente 20% (p/p), la hemicelulasa en una
concentración de aproximadamente el 15% (p/p), la amilasa en una
concentración de aproximadamente 10% (p/p), la glucanasa en una
concentración de aproximadamente 15% (p/p), la galactosidasa en una
concentración de aproximadamente 5% (p/p), la glucosa oxidasa en una
25 concentración de aproximadamente 5% (p/p), el ácido ascórbico en una
concentración de aproximadamente 0,1% (p/p) y un excipiente en una
concentración de aproximadamente 4,9% (p/p); y en donde el excipiente es
seleccionado de un grupo compuesto de sílice pirógena, bentonita, talco,
cloruro de sodio, sacarosa, maltodextrina, trehalosa, lactosa, arabinosa,
30 celulosa y floculantes aniónicos, o cualquier combinación de los mismos,
para obtener una mezcla.

- ii. Opcionalmente reteniendo la mezcla y luego se deja enfriar; y
- iii. neutralizando la mezcla del paso (i) o el paso (ii) mediante la adición de un regulador de pH, seguido de la retención de nuevo la mezcla y opcionalmente volviendo a enfriar, seguido de la adición opcional del excipiente o filtrando
5 ambos, para obtener el jugo de azúcar clarificado;
- 6. El proceso, tal como se reivindica en la Reivindicación 5, en la cual el jugo de azúcar se obtiene de una fuente seleccionada de un grupo compuesto de caña de azúcar, remolacha azucarera, azúcar sin refinar, y otro sustrato utilizado para el procesamiento del azúcar o cualquier combinación de los mismos.
- 10 7. El proceso, tal como se reivindica en la Reivindicación 5, en donde la amilasa se selecciona de un grupo compuesto de la α -amilasa, β -amilasa y γ -amilasa; la xilanasa se selecciona de un grupo compuesto de exo-xilanasa y endo-xilanasa; la celulasa se selecciona de un grupo compuesto de exo-celulasa, endo-celulasa y glucosidasa; la glucanasa se selecciona de un grupo compuesto de α -glucanasa, β -
15 glucanasa, xiloglucano específico endo-1,4-beta-glucanasa, xiloglucano específico exo-beta-1,4-glucanasa y pululanasa; y la galactosidasa se selecciona de un grupo compuesto de α -galactosidasa y β -galactosidasa.
- 8. El proceso, tal como se reivindica en la Reivindicación 5, en donde la mezcla se realiza mediante la adición de la mezcla de enzimas al jugo de azúcar con una
20 temperatura de 35°C a 45°C o en donde la mezcla se realiza mediante la adición de la mezcla de enzimas del jugo de azúcar hasta obtener una mezcla después de hervir la mezcla a una temperatura de 65°C a 75°C.
- 9. El proceso, tal como se reivindica en la Reivindicación 5, en donde la retención del Paso (ii) se lleva a cabo a una temperatura de entre 50°C a 80°C durante un
25 período de tiempo que oscila entre 5 a 15 minutos.
- 10. El proceso, tal como se reivindica en la Reivindicación 5, en donde el enfriamiento se realiza a una temperatura que oscila entre los 25°C a 30°C.
- 11. El proceso, tal como se reivindica en la Reivindicación 5, en donde la neutralización se lleva a cabo mediante la adición del regulador de pH
30 seleccionado de un grupo compuesto de óxido de calcio (cal), el uso del hidróxido

de calcio (lechada de cal), el ácido ortofosfórico y los compuestos inorgánicos de calcio o cualquier combinación de los mismos.

12. El proceso, tal como se reivindica en la Reivindicación 5, en donde el paso de retención se vuelve a realizar (iii) durante un período de tiempo que va desde los 20 a los 90 minutos, a una temperatura comprendida entre 90 °C a 110 °C o es para un período de tiempo que oscila entre 10 a 20 minutos, a una temperatura comprendida entre 90 °C a 110 °C.
13. El proceso, tal como se reivindica en la Reivindicación 5, en la cual el filtrado se realiza por el método seleccionado de un grupo compuesto de filtración de membrana, filtros de prensa y sedimentación o cualquier combinación de los mismos.
14. El proceso, tal como se reivindica en la Reivindicación 5, en donde el jugo de azúcar clarificado puede ser procesado para obtener azúcar clarificada.
15. El proceso, tal como se reivindica en la Reivindicación 5, en donde el proceso comprende los siguientes pasos:
 - a. Agregar la mezcla de enzimas al jugo de azúcar a una temperatura de entre 30°C a 45°C para obtener la mezcla.
 - b. Opcionalmente la retención a una temperatura de entre 50°C a 80°C durante un período de tiempo que va desde 5 a 15 minutos, seguido del enfriamiento de la mezcla a una temperatura de entre 25°C a 30°C; y
 - c. Neutralizar la mezcla del paso (a) o en el paso (b) mediante la adición de un regulador de pH, seguido de la retención durante un nuevo período de tiempo que va desde los 20 hasta los 90 minutos, a una temperatura comprendida entre 90°C a 110°C y opcionalmente volviendo a enfriar, seguido de la adición opcional de un excipiente o filtro o ambos, para obtener el jugo de azúcar clarificado.
16. El proceso, tal como se reivindica en la Reivindicación 5, en la cual el proceso comprende los siguientes pasos:
 - a. Agregar la mezcla de enzimas al jugo de azúcar hasta obtener una mezcla después de hervir la mezcla a una temperatura de entre 65°C a 75°C;

- b. Opcionalmente retener a una temperatura de entre 50°C a 80°C durante un período de tiempo que van desde 5 a 15 minutos, seguido del enfriamiento de la mezcla a una temperatura de entre 25°C a 30°C; y
- c. Neutralizar la mezcla del paso (a) o en el paso (b) mediante la adición de un regulador de pH, seguido por un nuevo período de retención que va desde los 10 hasta los 20 minutos, a una temperatura comprendida entre 90 °C a 110 °C y opcionalmente volver a de enfriar, seguido de la adición opcional del excipiente o filtrado o ambos, para obtener el jugo de azúcar clarificado.
17. El jugo de azúcar clarificado obtenido por medio del proceso, tal como se reivindica en la Reivindicación 5.
18. El jugo de azúcar clarificado, tal como se reivindica en la Reivindicación 17, en donde el jugo puede ser procesado para obtener azúcar clarificada.
19. Un proceso para la obtención de un compuesto de una mezcla de enzimas opcionalmente junto con un excipiente, tal como se reivindica en la Reivindicación 1, dicho proceso comprende el paso de los componentes combinados de la mezcla de enzimas para obtener la composición.
20. Un kit para la clarificación del jugo de azúcar o para obtener azúcar clarificada, dicho kit consta de una composición consistente de una mezcla de enzimas, opcionalmente junto con excipiente, en donde dicha mezcla de enzimas se selecciona de un grupo consistente de: (a) la xilanasas en una concentración de aproximadamente 40% (p/p), la celulasa en una concentración de aproximadamente 40% (p/p) y la hemicelulasa en una concentración de aproximadamente 20% (p/p), (b) la xilanasas en una concentración de aproximadamente 40% (p/p), la celulasa en una concentración de aproximadamente 40% (p/p), la hemicelulasa en una concentración de aproximadamente 10% (p/p) y glucanasa en una concentración de 10% (p/p), (c) la xilanasas en una concentración de aproximadamente 30% (p/p), la celulasa en una concentración de aproximadamente 30% (p/p), la hemicelulasa en una concentración de aproximadamente 20% (p/p), la amilasa en una concentración de aproximadamente 10% (p/p) y la glucanasa en una concentración de

aproximadamente el 10% (p/p), (d) la xilanasa en una concentración de aproximadamente 30% (p/p), la celulasa en una concentración de aproximadamente 30% (p/p), la hemicelulasa en una concentración de aproximadamente 15% (p/p), la amilasa en una concentración de aproximadamente 20% (p/p) y la glucanasa en una concentración de aproximadamente 5% (p/p), (e) la xilanasa en una concentración de aproximadamente 25% (p/p), la celulasa en una concentración de aproximadamente 25% (p/p), la hemicelulasa en una concentración de aproximadamente 15% (p/p), la amilasa en una concentración de aproximadamente 10% (p/p), la glucanasa en una concentración de aproximadamente 15% (p/p), la galactosidasa en una concentración de aproximadamente 5% (p/p) y la glucosa oxidasa en una concentración de aproximadamente 5% (p/p), y f) la xilanasa en una concentración de aproximadamente 25% (p/p), la celulasa en una concentración de aproximadamente el 20% (p/p), la hemicelulasa en una concentración de aproximadamente el 15% (p/p), la amilasa en una concentración de aproximadamente 10% (p/p), la glucanasa en una concentración de aproximadamente 15% (p/p), la galactosidasa en una concentración de aproximadamente 5% (p/p), la glucosa oxidasa en una concentración de aproximadamente 0.1% (p/p) y el excipiente en una concentración de aproximadamente 4.9% (p/p); y donde el excipiente se selecciona de un grupo compuesto de sílice pirógena, bentonita, talco, cloruro de sodio, sacarosa, maltodextrina, trehalosa, lactosa, arabinosa, celulosa y flocculante aniónico, o cualquier combinación de los mismos; un regulador del pH seleccionado de un grupo compuesto de óxido de calcio (cal), el uso del hidróxido de calcio (lechada de cal), ácido ortofosfórico y compuestos de calcio inorgánicos o cualquier combinación de los mismos; y un manual de instrucciones.

**"UNA COMPOSICIÓN, PROCESO Y UN KIT PARA EL PROCESAMIENTO
DEL AZÚCAR"**

RESUMEN

- 5 La presente descripción se refiere a un producto de sustitución de azufre con una base enzimática, un proceso de sustitución de azufre con una base enzimática y un kit que se puede utilizar en el procesamiento del azúcar. La presente descripción también se relaciona con una composición que comprende una mezcla de enzimas empleadas en el proceso para la obtención de un producto para la sustitución del azufre; y un producto
- 10 final obtenido después del procesamiento del azúcar.

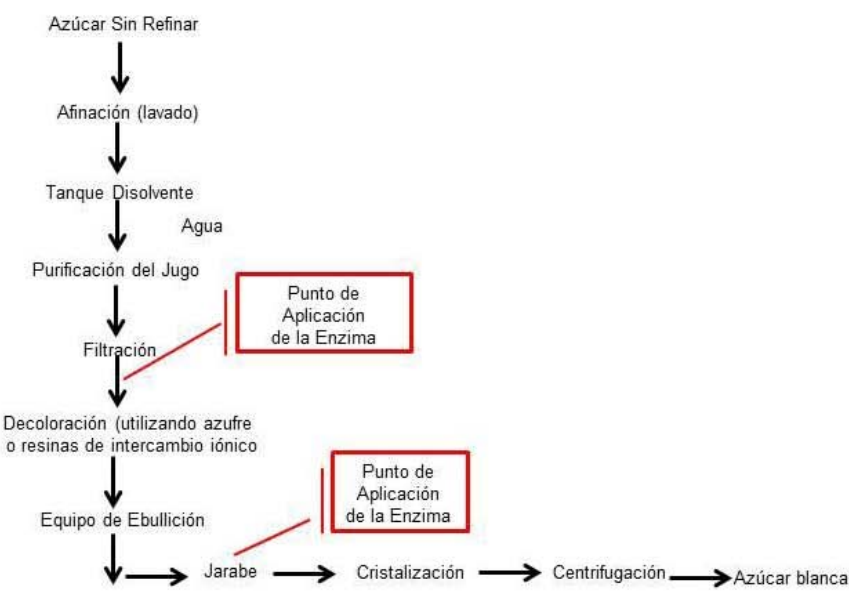


FIGURA 8

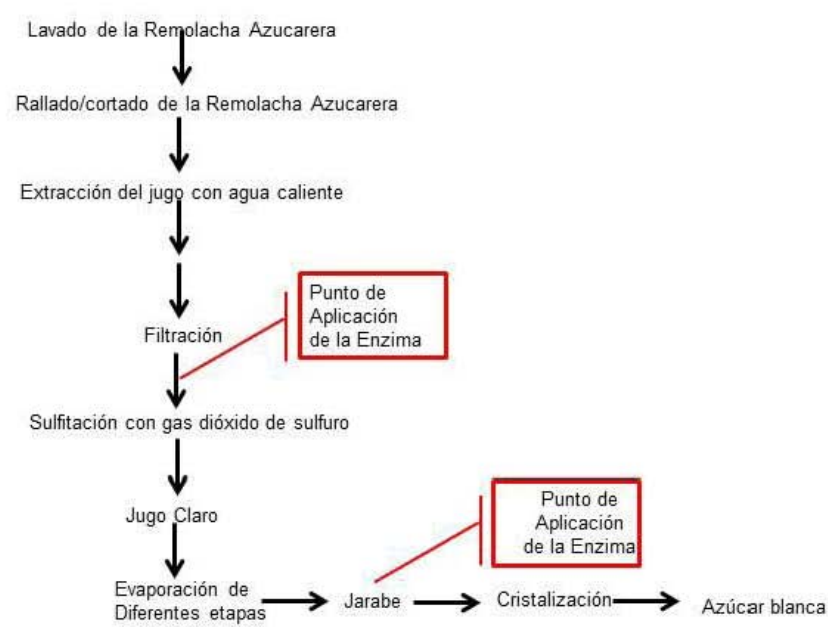
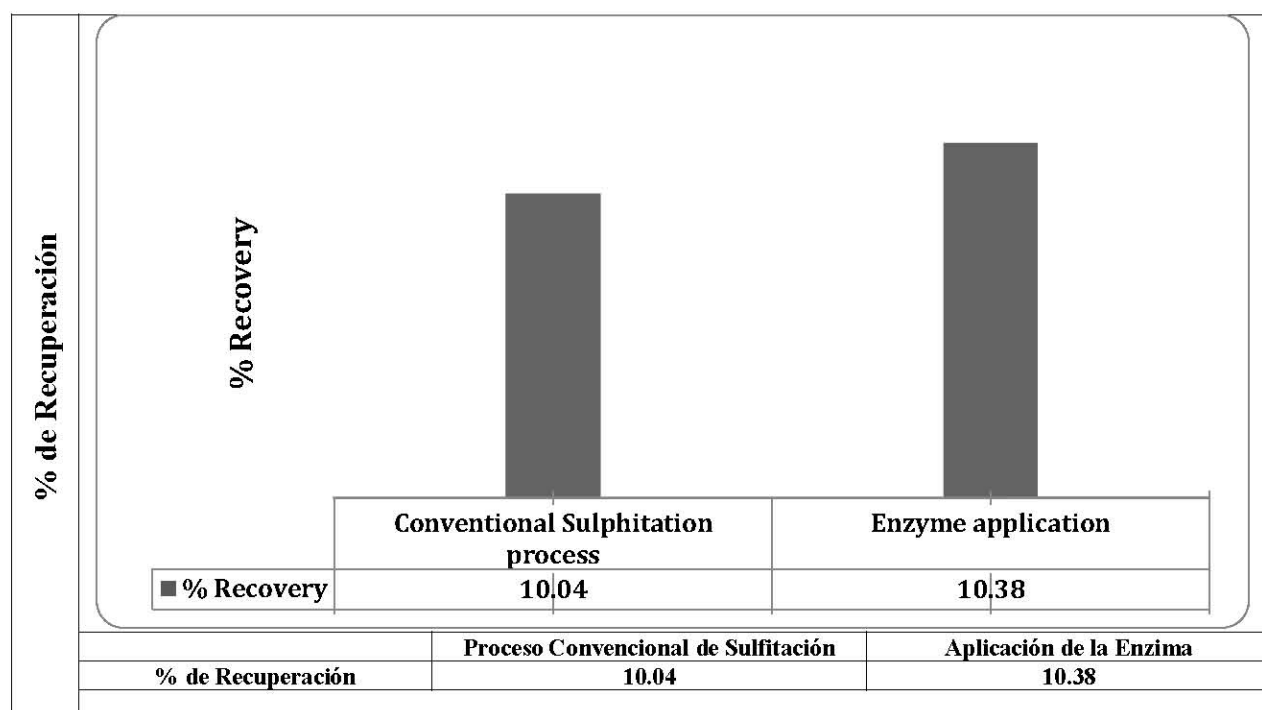


FIGURA 7

**FIGURA 6**

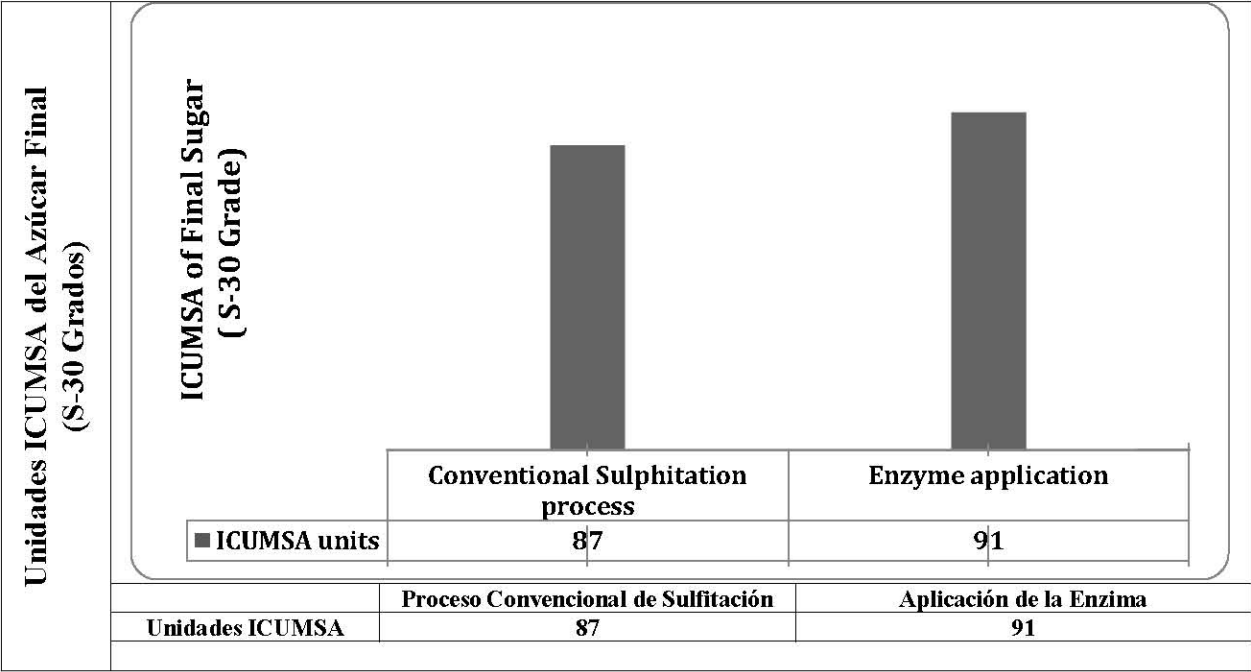
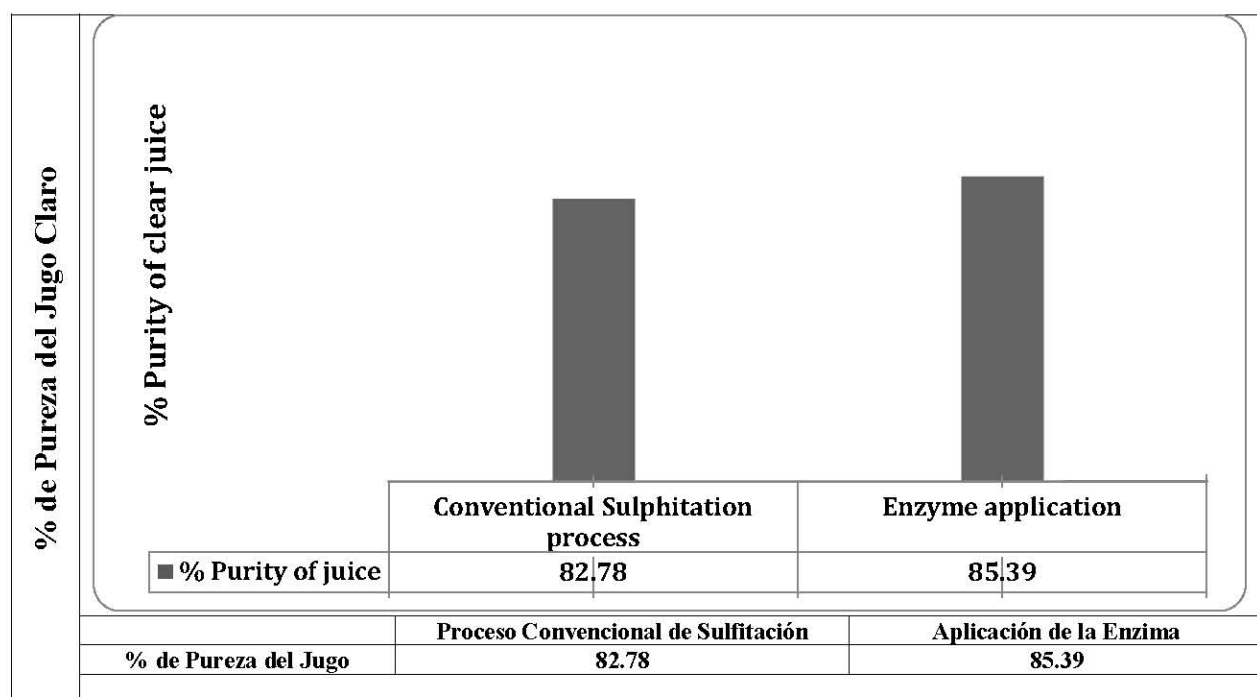


FIGURA 5

**FIGURA 4**

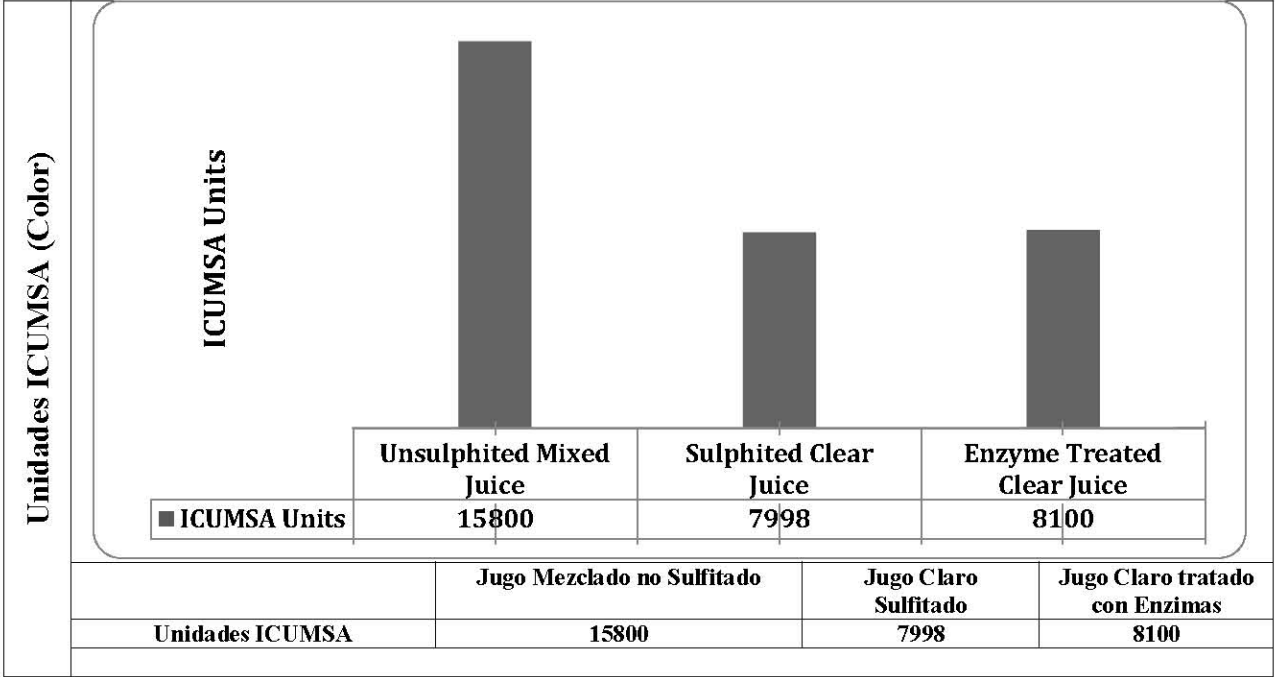


FIGURA 3

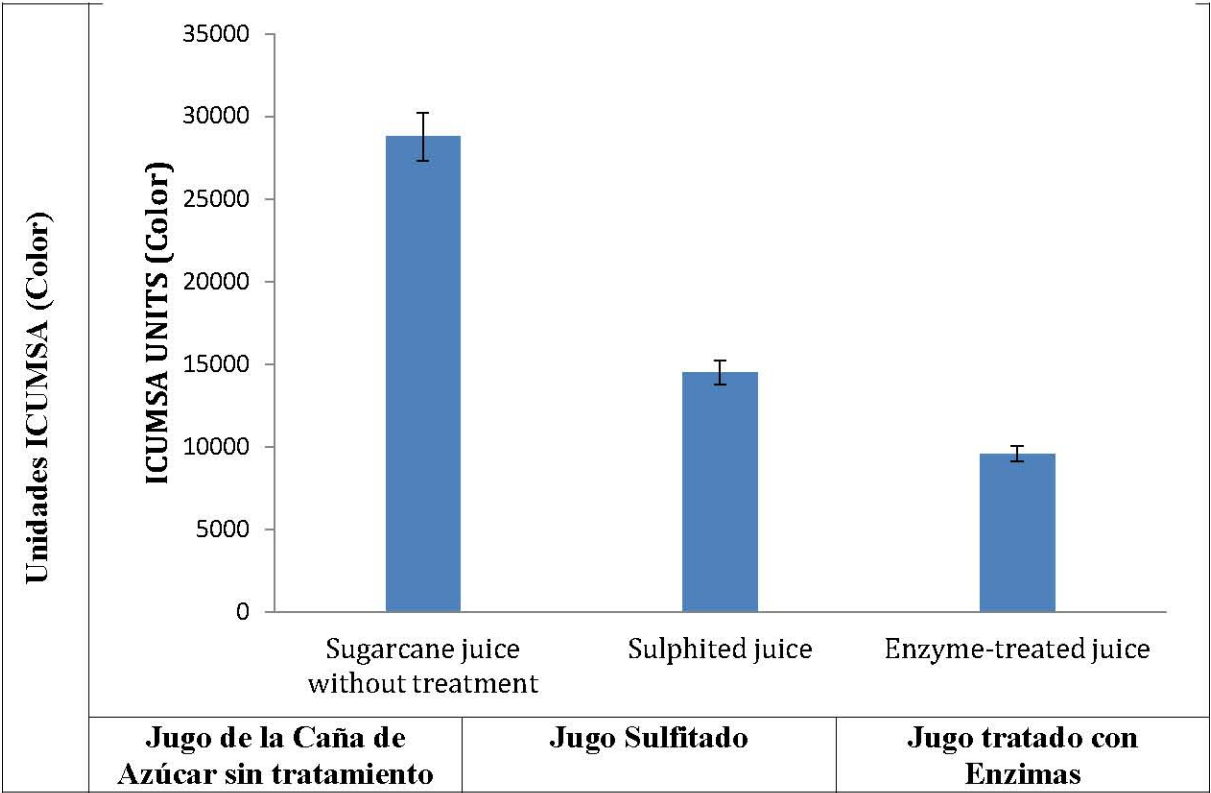


FIGURA 2

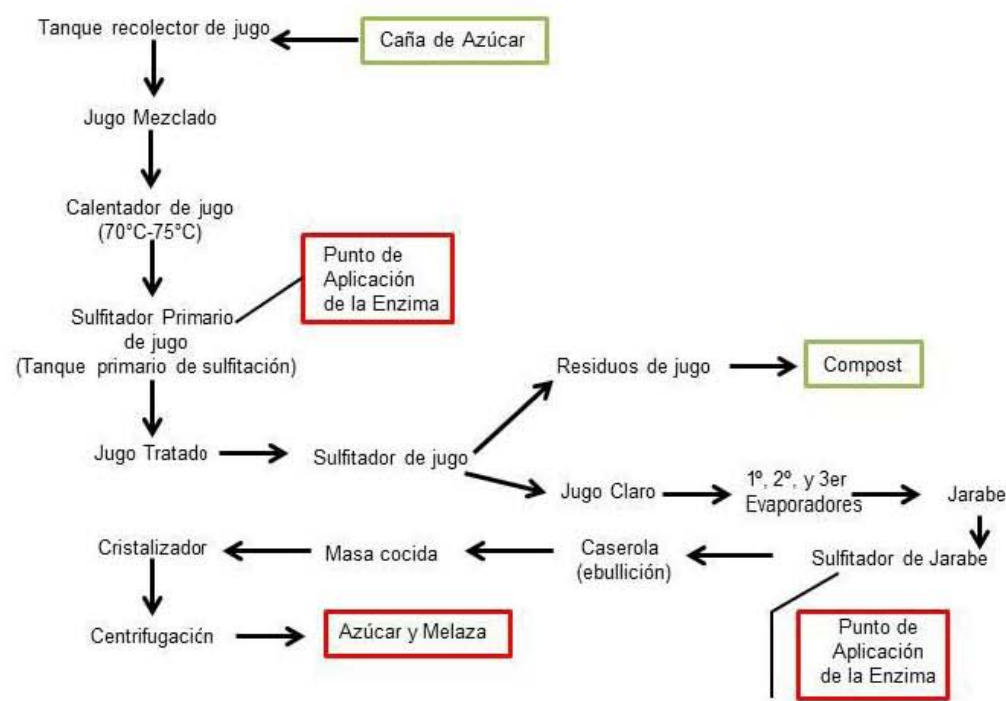


FIGURA 1