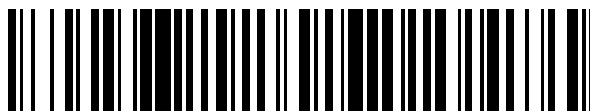


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 249**

51 Int. Cl.:

C12C 7/00 (2006.01)

C12P 19/00 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

C12P 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2007 E 07727693 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 2004794**

54 Título: **Proceso de trituración**

30 Prioridad:

04.04.2006 DK 200600483

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

28.01.2014

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

ELVIG, NIELS

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 440 249 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso de trituración.

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a un proceso de trituración mejorado utilizando molienda que comprende un complemento no gelatinizado.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Generalmente, la cerveza ha sido fermentada a partir sólo de malta de cebada, lúpulo y agua. No obstante, frecuentemente parte de la malta de cebada se sustituye con complementos tales como maíz, arroz, sorgo y trigo, almidón refinado o carbohidratos fácilmente fermentables tales como azúcar o jarabes. Los complementos se usan principalmente porque están fácilmente disponibles y proporcionan carbohidratos a un coste inferior que los disponibles de malta de cebada. Otras ventajas también puede ser conseguidas, por ejemplo estabilidad física mejorada, calidades de refrigeración superiores, y brillo superior.

[0003] La trituración es el proceso de conversión del almidón de la malta de cebada molida y complementos en azúcares no fermentables y fermentables para producir mosto de la composición deseada. La trituración tradicional implica mezclar malta molida de cebada y complementos con agua a una temperatura de conjunto y volumen para continuar los cambios bioquímicos iniciados durante el proceso de malteado. El proceso de trituración se conduce sobre un periodo de tiempo a varias temperaturas para activar las enzimas endógenas responsables de la degradación de proteínas y carbohidratos. No obstante, el arroz y almidón de maíz que son frecuentemente usados como complemento de almidón tienen una temperatura de gelatinización más alta que el almidón de malta. Por lo tanto, tales complementos se cocinan y gelatinizan en una "olla de cereales" separada antes de ser añadidos al triturado de malta. Así, mientras el uso de complementos reduce los costes del precio de materia prima éste requiere una inversión adicional en la olla de cereales al igual que un coste adicional de energía para la calefacción del complemento. Un proceso de trituración más simple que permita el uso de molienda de complemento no gelatinizado es así deseable.

[0004] Wieg et al. describen en "Brewing beer with enzymes" (Process Biochemistry, 1969, p. 33-38) que la idea de sustituir malta por cebada no malteada y preparaciones enzimáticas ha atraído mucho interés en la industria cervecera. El problema ha sido producir una enzima que puede sacarificar un triturado que consiste en gran medida en cereal no malteado y fermentar el mosto a una cerveza con propiedades organolépticas y bioquímicas aceptables. Los autores describen pruebas de elaboración realizadas con una preparación de amilasa/proteasa.

[0005] Wieg describe en "Technology of barley brewing" (Process Biochemistry, 1970, p. 46-48) que la elaboración de cerveza con cebada no malteada más enzimas causa problemas de filtración que pueden ser en gran medida superados usando tanto una enzima con actividad β -glucanasa como métodos de fresado apropiado.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0006] El inventor de la presente invención ha encontrado sorprendentemente que un complemento de almidón se puede añadir a la trituración de malta y ser eficazmente molido sin gelatinización previa. Así un complemento tal como sémola de maíz, almidón de maíz o almidón de arroz, se puede moler con la malta a temperaturas donde las enzimas de malta endógenas están activas. La licuefacción del complemento no gelatinizado requiere que las enzimas de malta endógena se suplementen por una composición enzimática exógenamente suministrada.

[0007] Por consiguiente, en un primer aspecto la invención proporciona un proceso para la producción de un mosto de cerveza, que comprende triturar una molienda que comprende malta y un complemento de almidón granulado en presencia de una composición enzimática exógenamente suministrada a una temperatura a la que las enzimas de malta endógena están activas. La invención además proporciona un proceso para la producción de un mosto de cerveza, que comprende; a) proporcionar un triturado que comprende i) malta, ii) complemento que comprende almidón granulado, y iii) una composición enzimática exógenamente suministrada, b) triturar dicho triturado a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial de dicho almidón granulado, c) triturar a una temperatura por encima de la temperatura de gelatinización inicial, y d) separar el bagazo del triturado y obtener un mosto.

[0008] En un segundo aspecto la invención proporciona un mosto producido por el proceso según el primer y segundo aspecto.

[0009] En un tercer aspecto la invención proporciona una cerveza producida por fermentación del mosto del tercer aspecto.

65

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0010] Es la intención de la presente invención proporcionar un proceso de trituración más simple que permita el uso de una molienda de complementos no gelatinizados en el proceso.

Definiciones

[0011] En toda esta descripción, varios términos que son generalmente entendidos por aquellos de habilidad ordinaria en la técnica son usados. Diferentes términos se usan con significado específico, no obstante, y son entendidos tal y como se define por lo siguiente.

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

[0013] El término "**malta**" se entiende como cualquier grano de cereal malteado, en particular cebada.

[0014] El término "**complemento**" se entiende como la parte de la molienda que no es de cebada malta. El complemento puede ser cualquier material vegetal rico en almidón tal como, pero no limitado a maíz, arroz, sorgo, y trigo. El complemento preferido para la invención es sémola de maíz.

[0015] El término "**triturado**" se entiende como una suspensión que contiene almidón que contiene malta de cebada molida, grano no malteado molido, otro material que contiene almidón, o una combinación de esto, mojado en agua para hacer mosto.

[0016] El término "**mosto**" se entiende como la solución no fermentada que rebosa después de la extracción de la molienda durante la trituración.

[0017] El término "**bagazo**" se entiende como los sólidos drenados restantes cuando la molienda ha sido extraída y el mosto separado.

[0018] El término "**cerveza**" es aquí entendido como un mosto fermentado, es decir una bebida alcohólica fermentada a partir de malta de cebada, opcionalmente complemento y lúpulo.

[0019] El término "**almidón granulado**" se entiende como almidón no gelatinizado, o almidón crudo.

[0020] El término "**temperatura inicial de gelatinización**" se entiende como la temperatura mínima en la que comienza la gelatinización del almidón. El almidón calentado en agua empieza a gelatinizar entre 50°C y 75°C; la temperatura exacta de gelatinización depende del almidón específico, y pueden fácilmente ser determinados por el experto en la materia. Así, la temperatura de gelatinización inicial puede variar según la especie de planta, la variedad particular de la especie de planta al igual que con las condiciones de crecimiento. En el contexto de esta invención la temperatura de gelatinización inicial de un almidón dado es la temperatura en la que la birrefringencia se pierde en 5% de los gránulos de almidón utilizando el método descrito por Gorinstein. S. y Lii. C., Starch/Stärke, Vol. 44 (12) pp. 461-466 (1992). Para almidón de maíz la temperatura de gelatinización inicial es aproximadamente 62°C (punto medio: 67°C, finalización: 72°C), y para almidón de arroz la temperatura de gelatinización inicial es aproximadamente 68°C (punto medio: 74,5 °C, finalización: 78°C) (Starch, 2nd ed. Industrial microscopy of starch by Eileen Maywald Snyder).

[0021] El término "**recuperación de extracto**" en el mosto se entiende como la suma de sustancias solubles extraídas de la molienda (malta y complementos) expresada en el porcentaje basado en sustancia seca.

[0022] El término "**identidad**" cuando se usa en relación a secuencias de polipéptidos o de ADN y referido a esta descripción se entiende como el grado de identidad entre dos secuencias que indican una derivación de la primera secuencia a partir de la segunda. La identidad puede ser adecuadamente determinada mediante programas informáticos conocidos en la técnica tal como GAP proporcionado en el paquete de programa GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453. Los siguientes ajustes para la comparación de secuencias polipeptídicas son usados: penalización de creación del espacio de 3.0 y penalización de extensión del espacio de 0.1.

[0023] En un primer aspecto de la invención, un proceso para la producción de mosto de cerveza se proporciona. El proceso comprende triturar una molienda que comprende malta y un complemento de almidón granulado en presencia de una composición enzimática exógenamente suministrada a una temperatura en la que las enzimas de malta endógenas están activas. La invención además proporciona un proceso para la producción de un mosto de cerveza, que comprende; a) proporcionar un triturado que comprende i) malta, ii) complemento que comprende almidón granulado, y iii) una composición enzimática exógenamente suministrada, b) triturar dicho triturado a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial de dicho almidón granulado, c) triturar a una

temperatura por encima de la temperatura de gelatinización inicial, y d) separar el bagazo de la trituración y obtener un mosto.

5 [0024] Conforme al primer aspecto de la presente invención, una molienda que comprende malta y un complemento de almidón granulado se muele en presencia de una composición enzimática exógenamente suministrada a una temperatura a la que las enzimas de malta endógenas por ejemplo alfa-amilasas, proteasas y beta-amilasas, de las que los procesos de trituración tradicional dependen, están activas.

10 [0025] El agua puede preferiblemente, antes de ser añadida a la molienda, ser precalentada para que la trituración logre la temperatura de triturado deseada en el momento de formación del triturado. Si la temperatura del triturado formado está por debajo de la temperatura de triturado deseada, calor adicional es preferiblemente suministrado para lograr la temperatura de proceso deseada. Preferiblemente, la temperatura de trituración deseada se logra dentro de 15 minutos, o más preferiblemente dentro de 10 minutos, tal como dentro de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 minutos o incluso más preferiblemente dentro de 1 minuto después de la formación del triturado, o de la forma más preferible la temperatura de trituración deseada se logra en la formación del triturado. El perfil de temperatura del proceso de trituración puede ser un perfil de un proceso de trituración convencional donde las temperaturas se fijan para conseguir la degradación óptima de la sustancia seca de molienda por las enzimas de malta.

20 [0026] La malta es preferiblemente derivada de uno o varios de los granos seleccionados de la lista que consiste en maíz, cebada, trigo, centeno, sorgo, milla y arroz. Preferiblemente, la malta es malta de cebada.

[0027] La molienda preferiblemente comprende de 0,5% a 99%, preferiblemente de 1% a 95%, más preferiblemente de 5% a 90%, incluso más preferiblemente de 10% a 80%, y de la forma más preferible de 50% a 70% de grano malteado.

25 [0028] Además de grano malteado, la molienda puede preferiblemente comprender complementos tal como maíz no malteado, u otro grano no malteado, tal como cebada, trigo, centeno, avena, maíz, arroz, milo, milla y/o sorgo, o almidón refinado y/o crudo y/o material que contiene azúcar derivado de plantas como trigo, centeno, avena, maíz, arroz, milo, milla, sorgo, patata, batata, mandioca, tapioca, sagú, plátano, remolacha azucarera y/o azúcar de caña. Para los complementos de la invención se pueden obtener de tubérculos, raíces, tallos, hojas, legumbres, cereales y/o granos enteros. Se prefiere el complemento obtenido de maíz y/o arroz, más preferido el complemento es almidón de arroz, almidón de maíz y/o sémola de maíz. El triturado preferiblemente comprende de 1% a 50%, preferiblemente de 5% a 45%, más preferiblemente de 10% a 40%, e incluso más preferiblemente de 20 a 35% de complemento de almidón. Complementos que comprenden carbohidratos fácilmente fermentables tales como azúcares o jarabes se pueden adicionar al triturado de malta antes, durante o después del proceso de trituración de la invención pero es preferiblemente adicionado después del proceso de trituración.

35 [0029] Antes de la formación del triturado, la malta y/o complemento son preferiblemente molidos y de la forma más preferiblemente molido en seco o húmedo.

40 [0030] Según la invención, una composición enzimática es exógenamente suministrada y se puede añadir a los ingredientes de trituración, por ejemplo el agua o la molienda, antes, durante o después de la formación del triturado. En una forma de realización particularmente preferida la composición enzimática comprende una alfa-amilasa (EC 3.2.1.1) y/o una glucoamilasa (EC 3.2.1.3). La alfa-amilasa es preferiblemente una alfa-amilasa bacteriana o y/o una alfa-amilasa fúngica, por ejemplo, una alfa-amilasa fúngica ácida. La glucoamilasa es preferiblemente una glucoamilasa fúngica.

45 [0031] Seleccionando las enzimas que forman la composición enzimática el perfil de azúcar del mosto resultante puede ser controlado. Una composición enzimática que comprende alfa-amilasa, preferiblemente una alfa-amilasa bacteriana, y poco o nada de glucoamilasa supondrá en un mosto rico en maltosa similar a un mosto todo de malta. Una composición enzimática que comprende glucoamilasa supondrá un mosto rico en glucosa.

50 [0032] En aún una forma de realización preferida otra enzima se añade, dicha enzima es seleccionada del grupo que consiste en una celulasa, una pululanasa, una proteasa, una enzima generadoras de maltosa, una lacasa, una lipasa, una fosfolipolasa, una fitasa, una fitato esterasa, y una xilanasas. Durante el proceso de trituración, el almidón extraído de la molienda es gradualmente hidrolizado en azúcares fermentables y dextrinas más pequeñas. Preferiblemente el triturado es almidón negativo en la prueba de yodo, antes de extraer el mosto.

55 [0033] La trituración se finaliza por trituración a temperatura de 70°C o más, preferiblemente al menos 71 °C, al menos 72°C, al menos 73°C, al menos 74°C, al menos 75°C, al menos 76°C al menos 77°C, al menos 78°C, como mínimo 79°C, al menos 80°C y más preferiblemente al menos 81 °C o incluso al menos 82°C o más.

60 [0034] La obtención del mosto del triturado incluye típicamente presionar el mosto del bagazo, es decir el grano insoluble y material de cáscara que forman parte de molienda. Agua caliente puede hacerse pasar a través del bagazo para enjuagar, o lavar, cualquier extracto restante de la molienda. Preferiblemente, la recuperación de extracto es al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, al menos 90%, mínimo 95%, al menos 98% y más

preferiblemente al menos 99% o incluso al menos 100%. El mosto se puede utilizar como es, o se puede concentrar y/o secar.

[0035] En una forma de realización preferida una molienda que comprende un 60-80% de malta de cebada y de 20% a 40% de almidón de maíz y/o sémola de maíz y/o almidón de arroz se muele en presencia de una alfa-amilasa. Preferiblemente, la alfa-amilasa AMY1 o AMY2 descrita abajo se usa en una cantidad de aproximadamente 2 KNU/g DM, preferiblemente en la cantidad de 0,05 a 10 KNU/g DM, más preferible 0,1 a 8 KNU/g DM, preferible incluso más 0,5 a 5 KNU/g DM. Preferiblemente, el almidón es molido utilizando un perfil de temperatura preferiblemente partiendo de aproximadamente 52°C, aumentando hasta aproximadamente 64°C, y triturado preferiblemente a aproximadamente 78°C o más.

[0036] Un segundo aspecto de la invención es un mosto producido por el método anteriormente descrito. Además del segundo aspecto de la invención, el mosto producido por el proceso del primer aspecto de la invención se puede fermentar para producir una bebida alcohólica, preferiblemente una cerveza. La fermentación del mosto puede incluir complementar el mosto con una suspensión de levadura que comprende levadura fresca, es decir levadura no previamente usada para la invención o la levadura puede ser levadura reciclada. La levadura aplicada puede ser cualquier levadura adecuada para la elaboración de cerveza, especialmente levaduras seleccionadas de *Saccharomyces* spp. tales como *S.cerevisiae* y *S. uvarum*, incluyendo variantes de estos organismos producidas natural o artificialmente. Los métodos para fermentación de mosto para la producción de cerveza se conocen por el experto en la técnica.

[0037] Los procesos de la invención pueden incluir la adición de hidrogel de sílice al mosto fermentado para aumentar la estabilidad coloidal de la cerveza. Los procesos pueden incluir además la adición de diatomita al mosto fermentado y la filtración para hacer la cerveza luminosa.

[0038] Un tercer aspecto de la invención es una cerveza producida por los procesos de la invención, tal cerveza puede ser cualquier tipo de cerveza. Tipos de cerveza preferidos comprenden cerveza inglesa de malta, cerveza inglesa de malta fuerte, cerveza negra, cerveza porter, cerveza rubia, agua tónica, cerveza export, soluciones de malta, cerveza happoushu, cerveza alta en alcohol, cerveza de baja en alcohol, cerveza baja en calorías o cerveza ligera.

ENZIMAS

[0039] Las enzimas exógenas que deben ser aplicadas en la presente invención deberían ser seleccionadas por su capacidad para retener actividad suficiente a la temperatura de proceso de los procesos de la invención, al igual que por su capacidad para retener actividad suficiente bajo el régimen de pH moderadamente ácido en la trituración y deberían ser adicionadas en cantidades eficaces. Las enzimas se pueden derivar de cualquier fuente, preferiblemente de una planta o unas algas, y más preferiblemente de un microorganismo, tal como de unas bacterias o unos hongos.

Alfa-amilasa (EC 3.2.1.1)

[0040] Una enzima de alfa-amilasa particular para ser usada en los procesos de la invención puede ser una alfa-amilasa de *Bacillus*, por ejemplo, una alfa-amilasa derivada de una cepa de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, y *B. stearothermophilus*. Una alfa-amilasa bacteriana preferida es una variante de alfa-amilasa de *B.stearothermophilus* recombinante con las mutaciones; I181* + G182* + N193F. La variante se muestra en SEC ID n.º:2 (AMY1). También preferidas son las alfa-amilasas con una secuencia de aminoácidos con al menos un 50%, tal como al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98%, o particularmente al menos un 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID n.º:2.

[0041] Más preferida incluso para la invención es una alfa-amilasa bacteriana que comprende un módulo de unión de almidón, preferiblemente un módulo de unión de almidón de familia 20. Tal alfa-amilasa se puede derivar de *Bacillus flavothermus* (sin. *Anoxybacillus contaminans*). Más preferida es una alfa-amilasa con al menos un 50% tal como al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98%, o particularmente al menos un 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID n.º:1 (AMY2).

[0042] Alfa-amilasas de *Bacillus* se pueden adicionar en las cantidades de 1,0-1000 NU/kg dm, preferiblemente de 2,0-500 NU/kg dm, preferiblemente 10-200 NU/kg dm.

[0043] Otra alfa-amilasa particular para ser usada en los procesos de la invención puede ser cualquier alfa-amilasa fúngica.

Particularmente preferidas son alfa-amilasas ácidas fúngicas. Especialmente contempladas están las alfa-amilasas fúngicas que muestran una identidad alta, es decir al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85% o incluso al menos un 90% de

identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID n.º:10 en WO96/23874.

[0044] Alfa-amilasas fúngicas se pueden adicionar en una cantidad de 1-1000 AFAU/kg DM, preferiblemente de 2-500 AFAU/kg DM, preferiblemente 20-100 AFAU/kg DM.

Glucoamilasas

[0045] Otra enzima particular para ser usada en los procesos de la invención puede ser una glucoamilasa (E.C.3.2.1.3) derivada de un microorganismo o una planta. Preferidas son las glucoamilasas de origen bacteriano o fúngico seleccionadas del grupo que consiste en glucoamilasas de *Aspergillus*, en particular glucoamilasa de *A. niger* G1 o G2 (Boel et al. (1984), EMBO J. 3 (5), p. 1097-1102), o variantes de la misma, tal como las descritas en WO92/00381 y WO00/04136; la glucoamilasa de *A. awamori* (WO84/02921), *A. oryzae* (Agric. Biol. Chem. (1991), 55 (4), p. 941-949), o variantes o fragmentos de las mismas.

[0046] Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* contempladas incluyen variantes para mejorar la termoestabilidad: G137A y G139A (Chen et al. (1996), Prot. Engng. 9, 499-505); D257E y D293E/Q (Chen et al. (1995), Prot. Engng. 8, 575-582); N182 (Chen et al. (1994), Biochem. J. 301, 275-281); enlaces disulfuro, A246C (Fierobe et al. (1996), Biochemistry, 35, 8698-8704; e introducción de residuos Pro en la posición A435 y S436 (Li et al. (1997), Protein Engng. 10, 1199-1204). Otras glucoamilasas contempladas incluyen glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular derivados de *Talaromyces emersonii* (WO99/28448), *Talaromyces leycettanus* (patente EE. UU. n.º Re. 32,153), *Talaromyces duponti*, *Talaromyces thermophilus* (US 4,587,215). Glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen glucoamilasas del género *Clostridium*, en particular *C. thermoamylolyticum* (EP 135,138), y *C. thermohydrosulfuricum* (WO86/01831). Glucoamilasas preferidas incluyen las glucoamilasas derivadas de *Aspergillus oryzae*, tal como una glucoamilasa con al menos un 90%, al menos un 92%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o particularmente al menos un 99%, incluso al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID n.º:2 en WO00/04136. También están contemplados los productos comerciales AMG 200L; AMG 300 L; SAN™ SUPER y AMG™ E (de Novozymes); OPTIDEX™ 300 (de Genencor Int.); AMIGASE™ y AMIGASE™ PLUS (de DSM); G-ZYME™ G900 (de Enzyme BioSystems); G- ZYME™ G990 ZR (glucoamilasa de *A. Niger* y bajo contenido de proteasa). Las glucoamilasas se pueden adicionar en cantidades eficaces bien conocidas por el experto en la técnica.

Celulasa (E.C. 3.2.1.4)

[0047] La celulasa puede ser de origen microbiano, tal como derivable de una cepa de un hongo filamentoso (p. ej., *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Fusarium*). Ejemplos específicos de celulasas incluyen la endoglucanasa (endoglucanasa I) obtenibles de *H. insolens* y además definidas por la secuencia de aminoácidos de la fig. 14 en WO 91/17244 y la endoglucanasa de 43 kD de *H. insolens* descrita en WO 91/17243.

[0048] Una celulasa particular para ser usada en los procesos de la invención puede ser una endoglucanasa, tal como un endo-1,4-beta-glucanasa. Se contemplan beta-glucanasas con al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos descrita como SEC ID n.º:1 en WO 2003/062409 tal como al menos un 92%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o particularmente al menos un 99%.

[0049] Preparaciones con celulasa disponibles comercialmente que se pueden usar incluyen CELLU-CLAST®, CELLUZYME®, CEREFLO® y ULTRAFLO® (disponible de Novozymes A/S), LAMINEX™ y SPEZYME® CP (disponible de Genencor Int.) y ROHAMENT® 7069 W (disponible de Röhm, Alemania).

[0050] Beta-glucanasas se pueden adicionar en las cantidades de 1,0-10000 BGU/kg dm, preferiblemente de 10-5000 BGU/kg dm, preferiblemente de 50-1000 BGU/kg dm y de la forma más preferible de 100-500 BGU/kg dm.

Enzimas desramificantes

[0051] Otra enzima aplicada en el proceso de la invención puede ser una enzima desramificante, tal como una isoamilasa (E.C. 3.2.1.68) o unas pululanastas (E.C. 3.2.1.41). La isoamilasa hidroliza enlaces alfa-1,6-D-glucosídicos de ramificaciones en la amilopectina y dextrinas de límite beta y se pueden distinguir de pululanastas por la incapacidad de isoamilasa para atacar al pululano, y por la acción limitada en las dextrinas de límite alfa. La enzima desramificante se puede adicionar en cantidades eficaces bien conocidas por el experto en la técnica.

Proteasa

[0052] Proteasas adecuadas incluyen proteasas microbianas, tales como proteasas bacterianas y fúngicas. Proteasas preferidas son proteasas ácidas, es decir, proteasas caracterizadas por la capacidad para hidrolizar proteínas bajo condiciones ácidas por debajo de pH 7.

[0053] Proteasas fúngicas ácidas contempladas incluyen proteasas fúngicas derivadas de *Aspergillus*, *Mucor*,

Rhizopus, *Candida*, *Coriolus*, *Endothia*, *Enthomophtra*, *Irpex*, *Penicillium*, *Sclerotium* and *Torulopsis*. Están especialmente contempladas las proteasas derivadas de *Aspergillus niger* (véase, por ejemplo, Koaze et al., (1964), Agr. Biol. Chem. Japan, 28, 216), *Aspergillus saitoi* (véase, por ejemplo, Yoshida, (1954) J. Agr. Chem. Soc. Japan, 28, 66), *Aspergillus awamori* (Hayashida et al., (1977) Agric. Biol. Chem., 42(5), 927-933, *Aspergillus aculeatus* (WO 95/02044), o *Aspergillus oryzae*, tal como la proteasa pepA; y proteasas ácidas de *Mucor pusillus* o *Mucor miehei*.

[0054] Están contempladas también proteasas neutras o alcalinas, tal como una proteasa derivada de una cepa de *Bacillus*. Una proteasa particular contemplada para la invención es derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* y tiene la secuencia obtenible de Swissprot como n.º de acceso P06832 al igual que proteasas con al menos un 90% identidad con dicha secuencia de aminoácidos, tal como al menos un 92%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o particularmente al menos un 99%.

[0055] Además están contempladas las proteasas con al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos descrita como SEC ID n.º:1 en las solicitudes de patentes danesas PA 2001 01821 y PA 2002 00005, tal como al menos un 92%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o particularmente al menos un 99%.

[0056] También están contempladas proteasas tipo papaína tales como proteasas dentro de E.C. 3.4.22.* (proteasa de cisteína), tal como EC 3.4.22.2 (papaína), EC 3.4.22.6 (quimopapaína), EC 3.4.22.7 (asclepapaína), EC 3.4.22.14 (actinidaina), EC 3.4.22.15 (catepsina L), EC 3.4.22.25 (glicil endopeptidasa) y EC 3.4.22.30 (caricaína).

[0057] Las proteasas son responsables de reducir la longitud total de proteínas de alto peso molecular a proteínas de peso molecular bajo en la trituración. Las proteínas de bajo peso molecular son una necesidad para la nutrición de levadura y las proteínas de alto peso molecular aseguran la estabilidad de espuma. Así es bien conocido por el experto en la materia que la proteasa debería ser adicionada en una cantidad equilibrada que, al mismo tiempo, permite ampliar aminoácidos libres para la levadura y deja suficientes proteínas de alto peso molecular para estabilizar la espuma. Las proteasas se pueden adicionar en las cantidades de 0,1-1000 AU/kg dm, preferiblemente 1-100 AU/kg dm y de la forma más preferible 5-25 AU/kg dm.

MATERIALES Y MÉTODOS

Enzimas

[0058]

AMY1: una variante de alfa-amilasa de *B.stearrowthermophilus* con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID n.º:4 en WO99/19467 con las mutaciones; I181* + G182* + N193F.

AMY2: una alfa-amilasa de *Anoxybacillus contaminans* con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID n.º:1.

MÉTODOS

Actividad proteolítica (AU)

[0059] La actividad proteolítica se puede determinar con hemoglobina desnaturalizada como sustrato. En el método de Anson-Hemoglobina para la determinación de la actividad proteolítica se digiere hemoglobina desnaturalizada, y la hemoglobina no digerida se precipita con ácido tricloroacético (ATC). La cantidad de producto soluble de ATC se determina con reactivo de fenol, que da un color azul con tirosina y triptófano.

[0060] Una unidad de Anson (AU) es definida como la cantidad de enzima que bajo condiciones estándar (es decir, 25°C, pH 7,5 y 10 min tiempo de reacción) digiere hemoglobina a un nivel inicial tal que se libera por minuto una cantidad de producto soluble de ATC que da el mismo color con reactivo de fenol que un miliequivalente de tirosina.

[0061] Una carpeta AF 4/5 que describe el método analítico con más detalle está bajo solicitud a Novo Nordisk A/S, Dinamarca.

Actividad de alfa-amilasa (NU)

[0062] La actividad amilolítica se puede determinar utilizando almidón de patata como sustrato. Este método se basa en la descomposición de almidón de patata modificado por la enzima, y la reacción es seguida mezclando muestras de la solución de almidón/enzima con una solución de yodo. Inicialmente, un color azul negro es formado, pero durante la descomposición del almidón el color azul se hace más débil y gradualmente se vuelve marrón rojizo, que es comparado con un estándar de vidrio coloreado.

[0063] Una unidad Kilo Novo de amilasa alfa (KNU) equivale a 1000 NU. Una KNU se define como la cantidad de

enzima que, bajo condiciones estándar (es decir, a 37°C +/- 0,05; 0,0003 M Ca²⁺; y pH 5,6) dextriniza 5,26 g de sustancia seca de almidón Merck Amylum soluble.

5 [0064] Una carpeta AF 9/6 que describe este método analítico con más detalle está disponible bajo solicitud a Novozymes A/S, Dinamarca.

Actividad de glucoamilasa (AGU)

10 [0065] La unidad Novo de glucoamilasa (AGU) es definida como la cantidad de enzima que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto a 37°C y pH 4,3.

15 [0066] La actividad se determina como AGU/ml por un método modificado después (AEL-SM-0131, disponible bajo solicitud de Novozymes) utilizando el equipo Glucose GOD-Perid de Boehringer Mannheim, 124036. Estándar: estándar de AMG, lote 7- 1195 AGU/ml. 375 microL de sustrato (1% de dosis de malta en 50 mM acetato sódico, pH 4,3) son incubados 5 minutos a 37°C. Se añaden 25 microL de enzima diluidos en el acetato sódico. La reacción se detiene después de 10 minutos añadiendo 100 microL de NaOH 0,25 M. 20 microL se transfieren a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se añaden 200 microL de solución GOD-Perid (124036, Boehringer Mannheim). Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la absorbancia se mide a 650 nm y la actividad se calcula en AGU/ml del estándar de AMG. Una descripción detallada del método analítico (AEL-SM-0131) está disponible bajo
20 solicitud de Novozymes.

Actividad de beta-glucanasa (BGU)

25 [0067] La actividad celulítica se puede medir en unidades de beta-glucanasa (BGU). La beta-glucanasa reacciona con beta-glucano para formar glucosa o carbohidrato reductor que se determina como azúcar reductor utilizando el método Somogyi-Nelson. 1 unidad de beta-glucanasa (BGU) es la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándar, libera glucosa o carbohidrato reductor con una capacidad de reducción equivalente a 1 µmol de glucosa por minuto. Condiciones estándar son 0,5% beta-glucano como sustrato a pH 7,5 y 30°C para un tiempo de reacción de 30 minutos. Una descripción detallada del método analítico (EB-SM-0070.02/01) está disponible bajo solicitud de
30 Novozymes A/S.

Proceso de trituración Congress estándar

35 [0068] El proceso de trituración Congress estándar fue realizado según el procedimiento de EBC: 4.5.1 extracto de malta: trituración Congress. El perfil de temperatura consistió en temperatura de trituración inicial de 45°C durante 30 minutos, en aumento a 70°C con 1,0°C/min durante 25 minutos, finalizado por 70°C durante 65 minutos que dan un periodo de trituración total de 2 horas.

Métodos adicionales

40 [0069] Métodos para análisis de productos crudos, mosto, cerveza etc. se pueden encontrar en Analytica-EBC, Analysis Committee of EBC, the European Brewing Convention (1998), Verlag Hans Carl Geranke-Fachverlag. Para la presente invención los métodos aplicados para determinación de los siguientes parámetros fueron:

Plato:	refractómetro.
N asimilable:	Basado en EBC: 8.10 pero con TNBS (ácido 2,4,6 trinitrobencen sulfónico) como reactivo en vez de ninhidrina. TNBS reacciona en una solución de grupos amino libres o aminoácidos y péptidos, que crea un complejo amarillo, que es medido espectrofotométricamente a 340nm.
Beta-glucano:	EBC: 8.13.2 (contenido de beta-glucano de peso molecular alto de mosto: Método Fluorimétrico).
Color:	EBC: 4.7.2
Modificación	EBC: 4.14 modificación y homogeneidad de malta, método Calcoflúor
Filtrabilidad:	Determinación de volumen de filtrado (ml): según EBC: 4.5.1 (extracto de malta: trituración Congress) subsección 8.2. Filtración: volumen de filtración se lee después de 1 hora de filtración a través de papel de filtro estriado, 320 mm diámetro. Schleicher y Schüll No.597 ^{1/2} , Machery, Nagel y Co. en embudos, 200 mm diámetro, equipado en matraces de 500 ml.
pH:	EBC: 8.17 (pH de mosto).
Índice Kolbach :	EBC: 4.9.1 (nitrógeno soluble de malta: método espectrofotométrico) y EBC: 3.3.1 (Nitrógeno Total de cebada: método de Kjeldahl (RM)).
Recuperación de extracto:	EBC: 4.5.1 (extracto de malta: trituración Congress, extracto en seco, rendimiento). El término recuperación de extracto en el mosto se define como la suma de sustancias solubles (glucosa, sacarosa, maltosa, maltotriosa, dextrinas, proteína, gomas, inorgánico, otras sustancias) extraídas de la molienda (malta y

complementos) expresadas en porcentaje en base a sustancia seca. La parte insoluble restante es definida como bagazo

a)

$$E_1 = \frac{P(M + 800)}{100 - P}$$

b)

$$E_2 = \frac{E_1 \cdot 100}{100 - M}$$

donde;

- E1 = el contenido de extracto de muestra, en % (m/m)
- E2 = el contenido de extracto de molienda seca, en % (m/m)
- P = el contenido de extracto en el mosto, en % Plato
- M = el contenido de humedad de la molienda, en % (m/m)
- 800 = la cantidad de agua destilada adicionada en la trituración a 100 g de molienda

Preparación de trituración

[0070] A menos que se especifique de otra manera la trituración fue realizada de la siguiente manera. La trituración fue preparada según EBC: 4.5.1 utilizando malta molida según EBC: 1.1. Ensayos de trituración fueron realizados en vasos de 500 ml con tapa que contiene cada uno una trituración con 50 g de molienda y ajustadas a un peso total de 250±0,2 g con agua precalentada a la temperatura de trituración inicial + 1°C. Durante la trituración los vasos fueron incubados en baño maría con agitación. Después de la trituración y antes de la filtración se añadió agua a cada vaso hasta un total de 300 g. Después de la filtración el mosto fue hervido durante 10 minutos y diluido 1:1 con agua. A porciones de 200 g de mosto se añadieron 1,2 g levadura y la fermentación fue realizada durante 4 días.

Ejemplos

Ejemplo 1

[0071] Una molienda que comprende un 65% de malta bien modificada y un 35% de almidón de maíz fue molida en presencia de una alfa-amilasa que utiliza el perfil de temperatura de trituración que consiste en 34 min a 52°C, aumento de 1°C/min durante 18 min, 60°C durante 60 min, aumento de 1 °C/min durante 18 min, 78°C durante 20 min seguido de enfriamiento a 20°C. El mosto y cerveza joven fueron analizados por HPLC. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Almidón de maíz: perfil de azúcar, Plato y rendimiento de mosto diluido, alcohol de cerveza joven.

Dosificación enzimática KNU/g DM	DP1 g/l	DP2 g/l	DP3 g/l	Azúcar Ferment. g/l	DP3+ g/l	Plato	Rendimiento%	Alcohol p/p	
-	0,00	9,91	26,39	11,57	47,87	28,70	7,47	88,85	2,17
AMY1	0,50	10,21	29,34	15,26	53,81	25,99	7,79	93,29	2,44
AMY1	0,75	10,05	28,83	14,29	53,17	24,21	7,57	90,30	2,46
AMY1	1,00	10,26	29,31	14,72	54,28	23,55	7,60	90,68	2,51
AMY1	1,50	10,65	30,26	15,39	56,29	22,82	7,72	92,31	2,59
(continuación)									
Dosificación enzimática KNU/g DM	DP1 g/l	DP2 g/l	DP3 g/l	Azúcar Ferment. g/l	DP3+ g/l	Plato	Rendimiento%	Alcohol p/p	
AMY1	2,00	10,71	30,33	15,74	56,78	22,00	7,71	92,28	2,61
AMY2	0,50	9,72	35,42	15,94	61,08	21,40	8,02	96,65	2,79
AMY2	0,75	9,21	35,32	15,82	60,35	18,56	7,72	92,38	2,78
AMY2	1,00	8,97	34,51	15,74	59,22	17,33	7,49	89,16	2,61
AMY2	1,50	9,14	36,11	16,76	62,01	16,66	7,70	92,10	2,85
AMY2	2,00	9,31	37,53	17,45	64,29	15,81	7,86	94,30	2,96

Ejemplo 2

[0072] Una molienda que comprende un 65% de malta bien modificada y un 35% de almidón de arroz fue molida en presencia de una alfa-amilasa que utiliza el perfil de temperatura de trituración que consiste en 34 min a 52°C, aumento de 1°C/min durante 18 min, 64°C durante 60 min, aumento de 1 °C/min durante 18 min, 78°C durante 20 min seguido de enfriamiento a 20°C. El mosto y cerveza joven fueron analizados por HPLC. Los resultados se

ES 2 440 249 T3

muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Almidón de arroz: perfil de azúcar, Plato y rendimiento de mosto diluido, alcohol de cerveza joven.											
Dosificación enzimática g/DM	KNU	DP1 g/l	DP2 g/l	DP3 g/l	Ferment. azúcar g/l	DP3+ g/l	Plato	Rendimiento%	Alcohol p/p	RDF	RDF
-	0,00	15,50	28,41	13,41	57,32	14,63	7,25	86,11	2,57	82,8	67,2
AMY1	0,50	14,70	26,99	13,79	55,48	12,87	7,52	89,87	2,70	83,9	68,1
AMY1	0,75	15,37	28,25	14,60	58,22	12,79	7,22	85,77	2,54	84,4	68,6
AMY1	1,00	14,33	26,65	13,94	54,93	11,69	7,31	86,94	2,56	84,9	68,9
AMY1	1,50	14,32	26,33	13,99	54,64	11,08	7,32	87,14	2,56	85,2	69,2
AMY1	2,00	14,46	26,39	14,34	55,18	11,22	7,41	88,38	2,60	85,4	69,4
AMY2	0,50	14,23	28,36	14,61	57,20	11,01	7,61	91,22	2,70	86,1	69,9
AMY2	0,75	14,41	28,69	15,05	58,15	10,55	7,49	89,52	2,62	86,2	70,0
AMY2	1,00	14,16	28,67	15,13	57,96	9,94	7,34	87,38	2,60	87,0	70,6
AMY2	1,50	14,53	29,60	15,78	59,91	9,53	7,72	92,72	2,76	88,1	71,5
AMY2	2,00	14,76	29,77	16,12	60,65	9,51	7,55	90,32	2,70	87,3	70,8

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 [0073]
- <110> Novozymes A/S
- 10 <120> 10934 LTM
- <130> 10934.000-DK
- <160> 2
- 15 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 619
- 20 <212> PRT
- <213> Anoxybacillus contaminans
- <220>
- <221> Señal
- 25 <222> (1).(31)
- <220>
- <221> Mat peptide
- <222> (32).(619)
- 30 <400> 1

ES 2 440 249 T3

Met Ser Leu Phe Lys Lys Ser Phe Pro Trp Ile Leu Ser Leu Leu Leu
 -30 -25 -20

Leu Phe Ser Phe Ile Ala Pro Phe Ser Ile Gln Thr Glu Lys Val Arg
 -15 -10 -5 -1 1

Ala Gly Ser Val Pro Val Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp
 5 10 15

Tyr Leu Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Asn Ala
 20 25 30

Gln Ser Leu Ala Asn Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala
 35 40 45

Tyr Lys Gly Thr Ser Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu
 50 55 60 65

Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr
 70 75 80

Gly Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Thr Ala
 85 90 95

Gly Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala
 100 105 110

Asp Gly Thr Glu Leu Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg
 115 120 125

Asn Gln Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe

ES 2 440 249 T3

Gly Val Ala Glu Lys Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp
 420 425 430

Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly
 435 440 445

Lys Thr Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile
 450 455 460 465

Asn Ala Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser
 470 475 480

Ile Trp Val Pro Lys Ile Ser Thr Thr Ser Gln Ile Thr Phe Thr Val
 485 490 495

Asn Asn Ala Thr Thr Val Trp Gly Gln Asn Val Tyr Val Val Gly Asn
 500 505 510

Ile Ser Gln Leu Gly Asn Trp Asp Pro Val His Ala Val Gln Met Thr
 515 520 525

Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Trp Thr Val Thr Ile Pro Leu Leu Gln Gly
 530 535 540 545

Gln Asn Ile Gln Phe Lys Phe Ile Lys Lys Asp Ser Ala Gly Asn Val
 550 555 560 565

Ile Trp Glu Asp Ile Ser Asn Arg Thr Tyr Thr Val Pro Thr Ala Ala
 565 570 575

Ser Gly Ala Tyr Thr Ala Ser Trp Asn Val Pro
 580 585

<210> 2

<211> 513

<212> PRT

5 <213> Bacillus stearothermophilus

<400> 2

Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu
 1 5 10 15

Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn
 20 25 30

Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys
 35 40 45

Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp
 50 55 60

ES 2 440 249 T3

Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr
 65 70 75 80
 Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met
 85 90 95
 Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly
 100 105 110
 Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn Gln
 115 120 125
 Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe
 130 135 140
 Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His
 145 150 155 160
 Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr
 165 170 175
 Lys Phe Arg Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu Phe Gly
 180 185 190
 Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His Pro Glu
 195 200 205
 Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn Thr Thr
 210 215 220
 Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser
 225 230 235 240
 Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Ser Gln Thr Gly Lys Pro
 245 250 255
 Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys Leu His
 260 265 270
 Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asp Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp Ala Pro
 275 280 285
 Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Ala Phe Asp
 290 295 300
 Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro Thr Leu
 305 310 315 320
 Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln Ala Leu
 325 330 335
 Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile

ES 2 440 249 T3

			340						345						350	
Leu	Thr	Arg	Gln	Glu	Gly	Tyr	Pro	Cys	Val	Phe	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Tyr	
		355					360					365				
Gly	Ile	Pro	Gln	Tyr	Asn	Ile	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Lys	Ile	Asp	Pro	
	370					375					380					
Leu	Leu	Ile	Ala	Arg	Arg	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Thr	Gln	His	Asp	Tyr	
385					390					395					400	
Leu	Asp	His	Ser	Asp	Ile	Ile	Gly	Trp	Thr	Arg	Glu	Gly	Gly	Thr	Glu	
				405					410					415		
Lys	Pro	Gly	Ser	Gly	Leu	Ala	Ala	Leu	Ile	Thr	Asp	Gly	Pro	Gly	Gly	
			420					425					430			
Ser	Lys	Trp	Met	Tyr	Val	Gly	Lys	Gln	His	Ala	Gly	Lys	Val	Phe	Tyr	
		435					440					445				
Asp	Leu	Thr	Gly	Asn	Arg	Ser	Asp	Thr	Val	Thr	Ile	Asn	Ser	Asp	Gly	
	450					455					460					
Trp	Gly	Glu	Phe	Lys	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Val	Ser	Val	Trp	Val	Pro	
465					470					475					480	
Arg	Lys	Thr	Thr	Val	Ser	Thr	Ile	Ala	Arg	Pro	Ile	Thr	Thr	Arg	Pro	
				485					490					495		
Trp	Thr	Gly	Glu	Phe	Val	Arg	Trp	Thr	Glu	Pro	Arg	Leu	Val	Ala	Trp	
			500					505					510			
Pro																

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la producción de un mosto de cerveza, que comprende;
- 5 a) proporcionar una molienda que comprende malta y un complemento de almidón no gelatinizado derivado de maíz, arroz, sorgo o milla,
b) triturar, sin gelatinización previa del complemento de almidón, la molienda en presencia de una alfa-amilasa exógenamente suministrada a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial de dicho almidón,
10 c) triturar a una temperatura por encima de la temperatura de gelatinización inicial, y
d) separar el bagazo de la trituración para obtener el mosto, y
- donde el complemento no se cocina y gelatiniza en una olla de cereales separada.
- 15 2. Proceso de la reivindicación precedente, donde el complemento comprende almidón de maíz o almidón de arroz.
3. Proceso de cualquier reivindicación precedente, donde la molienda del triturado comprende un 60-80% de malta de cebada.
- 20 4. Proceso de cualquier reivindicación precedente, donde la molienda del triturado comprende de un 10% a un 40% de complemento de almidón.
5. Proceso de cualquier reivindicación precedente, donde la alfa-amilasa es una alfa-amilasa bacteriana.
- 25 6. Proceso de la reivindicación precedente, donde la alfa-amilasa bacteriana comprende un módulo de unión de almidón.
7. Proceso de cualquier reivindicación precedente, donde la alfa-amilasa es un polipéptido con al menos un 50% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID n.º:1.
- 30 8. Proceso de cualquier reivindicación precedente, donde la alfa-amilasa es un polipéptido con al menos un 50% de identidad con cualquier secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID n.º:2.
9. Proceso según la reivindicación 7 o 8 donde la alfa-amilasa se usa en una cantidad de 0,5 a 5 KNU/g DM.
- 35 10. Proceso para la producción de cerveza, que comprende producir un mosto de cerveza por el proceso de cualquier reivindicación precedente y fermentar el mosto.