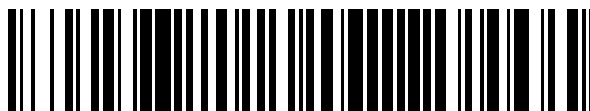


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 127**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2010** **E 10704371 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014** **EP 2398893**

54 Título: **Método de elaboración utilizando proteasas fúngicas o bacterianas**

30 Prioridad:

19.02.2009 EP 09153182

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

10.03.2015

73 Titular/es:

NOVOZYMES A/S (100.0%)

Krogshøjvej 36

2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es:

KREISZ, STEFAN;

HELDT-HANSEN, HANS PETER;

OESTERGAARD, PETER RAHBEK;

FREDERIKSEN, ANNE METTE y

BAEKGAARD, LONE

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 531 127 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

Método de elaboración utilizando proteasas fúngicas o bacterianas

5 Campo de la invención

[0001] Esta solicitud se refiere a un método de elaboración donde se usa una proteasa termoestable para el control de la estabilidad coloidal de bebidas. Las proteasas pueden ser obtenidas a partir de *Nocardiopsis*, *Bacillus*, o *Thermoascus*. La proteasa se añade bien a la malta remojada durante el filtrado y/o al mosto después del filtrado pero antes del hervido del mosto.

Antecedentes de la invención

[0002] Muchas bebidas como la cerveza, el vino, el zumo, etc. desarrollan precipitados durante la producción o tras el almacenamiento. Este fenómeno se describe como formación de neblina. Generalmente se cree que la formación de neblina se debe a la interacción de proteínas y polifenoles presentes en la bebida. Esta interacción lleva a la formación de suspensión insoluble o semi-soluble de partículas coloidales. Ya que la formación de la neblina se asemeja generalmente a la nebulosidad producida por contaminación microbiana, se prefiere generalmente que las bebidas, particularmente la cerveza, sean muy claras y transparentes incluso tras un largo almacenamiento. Por lo tanto se han desarrollado procesos para reducir tal formación de neblina. Estos procesos van dirigidos a las proteínas o los polifenoles o ambos.

[0003] Geles de sílice, bentonita, polivinilpolipirrolidona (PVPP), etc. se han usado para adsorber proteínas y polifenoles, reduciendo la formación de neblina y mejorando la estabilidad coloidal. No obstante tales materiales, cuando son usados reiteradamente, resultan en una disminución de las ganancias y consecuentemente llevan a costes aumentados. Además, también eliminan otros compuestos deseables de la bebida, lo cual puede afectar a su calidad.

[0004] Las enzimas, particularmente las proteasas, también se usan durante la fermentación para mejorar la estabilidad coloidal de bebidas, particularmente cerveza. Generalmente, se han usado proteasas como papaína y bromelaina para reducir la formación de neblina fría. No obstante estas proteasas no son específicas y se ha demostrado que afectan a la estabilidad de la espuma de la bebida hidrolizando las proteínas responsables de la formación de la espuma. Además éstas también causan cambios de sabor en la bebida. Otra realización ha sido usando proteasas específicas que hidrolizan sólo las proteínas que forman neblina hidrofílica pero no las proteínas que forman espuma hidrofóbica. Por ejemplo, se conoce una endoproteasa de prolil específica que específicamente hidroliza las proteínas que forman la neblina mejorando así la estabilidad coloidal y reteniendo la estabilidad de la espuma. El uso de proteasas durante la fermentación puede retener su actividad en la cerveza final, lo cual es generalmente indeseable. La inactivación por pasteurización puede además llevar a un sabor a quemado en la cerveza.

[0005] Todavía existe una necesidad de procesos mejorados para la estabilización coloidal de bebidas, especialmente cerveza.

Resumen de la invención

[0006] En un aspecto, la invención se refiere a un método de elaboración de una cerveza que comprende:

[0007] Un método de elaboración de una cerveza que comprende añadir una proteasa termoestable a un mosto después del filtrado pero antes del hervido del mosto, donde termoestable significa que la actividad de la proteasa es al menos el 70% de la actividad de referencia cuando es evaluada según el siguiente método: se diluye la proteasa a 1mg/ml en un tampón de ensayo que comprende 100 mM ácido succínico, 100 mM HEPES, 100 mM CHES, 100 mM CABS, 1 mM CaCl_2 , 150 mM KCL, 0.01% Tritón X-100, pH ajustado a 5.5 con NaOH. La proteasa es posteriormente preincubada en i) hielo, ii) 10 min a 70°C. El sustrato para el que la proteasa tiene actividad se suspende en 0.01% Tritón X-100. Para iniciar la reacción, se añaden 20 μl al tubo y se incuban en un termomezclador Eppendorf a 70°C, 1400 r.p.m. durante 15 min. La reacción se detiene colocando los tubos en el hielo. Las muestras son centrifugadas en frío a 14000 g durante 3 min, y se mide OD_{590} en el sobrenadante. El valor OD_{590} de las muestras en blanco se sustrae de los valores correspondientes de las muestras tratadas con proteasa. La termoestabilidad de la proteasa se determina calculando la actividad de porcentaje de las muestras preincubadas a 70° en comparación con las muestras incubadas en hielo (100%).

[0008] En un aspecto, la proteasa es obtenible a partir de *Nocardiopsis*, *Thermoascus* o *Bacillus*.

[0009] En un aspecto, la invención se refiere a un método de elaboración de una cerveza que comprende poner en contacto un mosto después del filtrado pero antes del hervido del mosto con una proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde con las SEC ID nº 1, 2, o 3 y variantes de las mismas que tienen al menos el 70% de identidad con las SEC ID nº 1, 2, o 3.

[0010] En un aspecto, el método lleva a una reducción en la neblina en el producto de cerveza.

5 [0011] En un aspecto, la invención se refiere a un método de elaboración de una cerveza que comprende poner en contacto una malta remojada durante el filtrado y/o un mosto después del filtrado pero antes del hervido del mosto con una proteasa termoestable por lo cual aumenta la estabilidad coloidal cuando se compara con la cerveza fermentada de forma convencional.

10 [0012] En un aspecto, la puesta en contacto se lleva a cabo a una temperatura de al menos 60 grados centígrados (posteriormente referido aquí como °C). En otro aspecto, la temperatura es al menos 70°C. En otro aspecto, la temperatura es al menos 74°C, más preferiblemente al menos 75°C, más preferiblemente al menos 76°C, más preferiblemente al menos 77°C y de la forma más preferible al menos 78°C.

15 [0013] En un aspecto, la puesta en contacto se lleva a cabo durante un periodo entre 10 minutos (posteriormente referido aquí como min) y 5 horas, preferiblemente, la puesta en contacto es entre 20 min y 3 horas, más preferiblemente entre 30 min y 2 horas y de la forma más preferible entre 30 min y 1 hora.

Breve descripción de los dibujos

20 [0014] La Fig. 1 muestra la medición de neblina en el mosto y cerveza recibida de una malta remojada tratada con una proteasa de la SEC ID nº 1 frente a la malta remojada no tratada (control). El eje Y denota los valores en unidad nefelométrica de turbidez (NTU).

Descripción detallada de la invención

25 [0015] El proceso de elaboración de cerveza es bien conocido por el experto en la técnica. Se puede perfilar un procedimiento convencional de la siguiente manera: la materia prima es cebada malteada (es decir humectada, germinada y posteriormente secada) y/o adjuntos no malteados, llamados molienda. Durante la trituration, donde la molienda es molida y mezclada con agua, calentada y agitada, los carbohidratos se degradan a azúcares fermentables con la ayuda de las enzimas naturalmente presentes en la malta. Después de la trituration, es necesario separar el extracto líquido (el mosto) de los sólidos (partículas de bagazo y adjuntos) para obtener mosto claro. Este proceso se describe como filtrado. Antes del filtrado, la temperatura de la malta remojada puede ser elevada a aproximadamente 75-78°C (165-173°F) (conocido como mashout). El filtrado del mosto es importante debido a que los sólidos están enriquecidos con grandes cantidades de proteína, almidón pobremente modificado, materia grasa, silicatos, y polifenoles (taninos) y proteínas. El extracto retenido en el bagazo después de la recogida del primer mosto también puede ser lavado añadiendo agua caliente encima de la torta de filtrado. Este proceso es llamado lavado. El agua caliente fluye a través del bagazo y disuelve el extracto restante. El mosto diluido se llama segundo mosto y su extracto reduce desde la gravedad original del primer mosto hasta 1-2 %. Después de la adición de lúpulo, el mosto es hervido. Por la presente numerosas sustancias incluyendo diferentes proteínas son desnaturalizadas y tendrá lugar una precipitación de polifenoles. Tras el enfriamiento y la eliminación de los precipitados, el mosto de cerveza final (a) se airea y se añade levadura. Después de una fermentación principal, que dura normalmente 5-10 días, la mayor parte de la levadura es eliminada y la así llamada cerveza verde (b) es almacenada a baja temperatura, normalmente a 0 - 5°C durante 1 - 12 semanas. Durante este periodo la levadura restante precipitará junto con los polifenoles. Para eliminar el exceso restante de polifenoles se realiza una filtración. La cerveza fermentada (c) puede ahora ser carbonizada antes del embotellado. El dióxido de carbono no sólo contribuye a la "plenitud" o "cuerpo" percibidos y como intensificador de sabor, también actúa en cuanto a la mejora del potencial de formación de espuma y juega un papel importante en el alargamiento del tiempo de almacenamiento del producto.

50 [0016] El término "cerveza" tal como se utiliza en este caso pretende cubrir al menos cerveza preparada a partir de maltas remojadas preparadas a partir de cereales no malteados así como todas las maltas remojadas preparadas a partir de cereales malteados, y todas las maltas remojadas preparadas a partir de una mezcla de cereales malteados y no malteados. El término "cerveza" también cubre cervezas preparadas con adjuntos, y cervezas con todo el contenido de alcohol posible.

55 [0017] Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la interacción entre proteínas y polifenoles en la cerveza almacenada a temperaturas bajas o durante mucho tiempo, lleva al desarrollo de agregados a los que se refiere como neblina. Ya que la formación de neblina afecta a la calidad (también llamada estabilidad coloidal) de la cerveza, se han desarrollado métodos que impiden tal formación de neblina. Durante el proceso de elaboración, una mayoría de los complejos polifenol-proteína precipitan mediante el enfriamiento del líquido durante la maduración de la cerveza. Cualquier polifenol y/o proteína restante es eliminado utilizando PVPP, gel de sílice, bentonita, etc.

60 [0018] Según esta invención, la estabilidad coloidal de una cerveza se define como la cantidad de ciclos calientes antes de que la inestabilidad coloidal medida en unidades EBC se vuelva mayor de 2. Un ciclo caliente corresponde a aproximadamente 25 días de tiempo de almacenamiento (MEBAK 2.15.2.1, Fociertmethode, Vorausbestimmung der chemisch-physikalischen Stabilität, Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnische Analysekommision

(MEBAK), Selbstverlag der MEBAK, Freising Weihenstephan).

[0019] La neblina es también referida como "nebulosidad" o "turbidez" o "inestabilidad coloidal" en la técnica y por lo tanto se puede usar de forma intercambiable.

[0020] Otro método para reducir la formación de neblina es a través del uso de proteasas.

[0021] Las proteasas como la papaína, que tienen una actividad de amplio espectro, son utilizadas para disociar las proteínas, produciendo posiblemente agregados de polifenol-proteína inferiores y/o más solubles. No obstante el uso de estas enzimas también afecta a las proteínas implicadas en la estabilidad de la espuma, afectando así a la calidad del producto final.

[0022] También son conocidas las proteasas específicas como proteasas específicas de prolil o proteasas específicas de alanina, las cuales actúan hipotéticamente preferentemente en las proteínas activas de neblina y no en proteínas activas de espuma, preservando así la estabilidad de la espuma del producto final.

[0023] Se prefiere que el producto final esté libre de actividad de enzimas añadidas externamente. Así las enzimas, como las anteriores proteasas, son añadidas de forma convencional a la malta remojada (agua + molienda) durante el proceso de trituración. Así éstas se activan durante la trituración y se inactivan o degradan durante el filtrado y hervido del mosto.

[0024] Los inventores han descubierto sorprendentemente que la adición de una proteasa a una malta remojada durante el filtrado y/o a un mosto después del paso de filtrado pero antes del paso de hervido del mosto lleva a una buena estabilización coloidal.

[0025] Sorprendentemente los inventores han descubierto que las proteasas que o bien no muestran ningún efecto, o bien muestran un efecto negativo directo en la estabilización coloidal cuando son añadidas al principio de la trituración, muestran en realidad un aumento óptimo en la estabilidad coloidal de la cerveza cuando son añadidas durante y/o después del filtrado. La falta de efecto cuando las enzimas son añadidas en la trituración podría tener diferentes razones, siendo una que las proteasas se inhiben en la malta remojada. Los inventores han descubierto que el efecto negativo de una proteasa añadida en la trituración mientras es positivo cuando es añadida más tarde en el proceso está relacionado con la capacidad de la proteasa para liberar materia a base de proteína en el mosto cuando es añadida pronto en el proceso que produce un impacto negativo en la estabilidad coloidal aunque la enzima sea capaz de degradar la proteína que se forma coloidalmente. Los inventores han descubierto que esto se puede evitar si la proteasa es añadida después del filtrado o suficientemente tarde en el proceso para limitar la liberación de material de proteína en el mosto, por ejemplo durante el filtrado, más específicamente durante el lavado. Sorprendentemente los inventores han observado que la cantidad liberada de proteína debe ser mantenida a menos de un aumento del 10% en el nivel de proteína medido por Kjeldahl, preferiblemente a menos de un 9%, más preferiblemente a menos de un 8%, más preferiblemente a menos de un 7%, más preferiblemente a menos de un 6%, y de la forma más preferible a menos de un 5%.

[0026] Sorprendentemente, los inventores han descubierto que la cantidad de proteína liberada en alrededor de un PM de 10.000 KD (banda 4-6) se mantiene a un nivel relativamente bajo.

[0027] Sorprendentemente, también se descubrió que una proteasa que no se considera específica para la acción sobre proteínas activas de neblina y así no con actividad baja en proteínas activas de espuma, no sólo puede proporcionar una buena estabilización coloidal sino también sin ningún o sólo con un ligero efecto negativo en la estabilidad de espuma de la cerveza, cuando es añadida a una malta remojada durante el filtrado y/o a un mosto después del filtrado pero antes del hervido del mosto.

[0028] Sorprendentemente, los inventores han descubierto que las proteasas que son también termoestables proporcionan una buena estabilización coloidal cuando son añadidas a una malta remojada durante el filtrado y/o a un mosto después del filtrado pero antes del hervido del mosto.

[0029] Sorprendentemente, el efecto de estabilización coloidal de la(s) proteasa(s) aplicada(s) al mosto después del filtrado podría ser obtenido en un periodo de 2 horas lo cual es más corto que los varios días cuando son aplicadas en la fermentación.

[0030] Los inventores han descubierto sorprendentemente que las proteasas termoestables tienen una actividad de estabilización coloidal óptima cuando son añadidas a la malta remojada durante el filtrado y/o al mosto después del filtrado pero antes del hervido del mosto.

[0031] Los inventores han descubierto también que el uso de una proteasa que retiene sustancialmente su actividad durante y/o después del filtrado en la elaboración lleva sorprendentemente a una estabilidad coloidal aumentada de la cerveza.

[0032] Así la invención en un aspecto, se refiere a un método de elaboración de una cerveza que comprende poner en contacto una malta remojada durante el filtrado y/o un mosto después del filtrado pero antes del hervido del mosto con una proteasa obtenible de *Nocardiopsis*, *Bacillus* o *Thermoascus*.

5 [0033] Los términos "malta remojada", "filtrado" y "mosto" tienen el significado convencional en la técnica.

[0034] Las proteasas son conocidas en la técnica. Son polipéptidos con actividad de proteasa y también son referidos como peptidasas, proteinasas, hidrolasas de péptido, o enzimas proteolíticas. Las proteasas pueden ser del tipo exo que hidroliza péptidos que inician a cualquier final de las mismas, o bien del tipo endo que actúan internamente en las cadenas de polipéptido (endopeptidasas). Las endopeptidasas muestran actividad en los sustratos de péptido bloqueados terminalmente N- y C- que son relevantes para la especificidad de la proteasa en cuestión. El término "proteasa" se define aquí como una enzima que hidroliza enlaces peptídicos. Incluye cualquier enzima que pertenece al grupo enzimático EC 3.4 (incluyendo cada una de las trece subclases del mismo). El número EC se refiere a la Nomenclatura Enzimática 1992 de NC-IUBMB, Academic Press, San Diego, Calif., incluyendo suplementos 1 5 publicados en Eur. J. Biochem. 1994, 223, 1 5; Eur. J. Biochem. 1995, 232, 1 6; Eur. J. Biochem. 1996, 237, 1 5; Eur. J. Biochem. 1997, 250, 1 6; y Eur. J. Biochem. 1999, 264, 610 650; respectivamente. La nomenclatura es suplementada y actualizada regularmente; ver por ejemplo la Red informática mundial (WWW) en www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html.

20 [0035] Las proteasas son clasificadas en base a su mecanismo catalítico en los siguientes grupos: serín proteasas (S), cisteín proteasas (C), aspartil proteasas (A), metaloproteasas (M), y proteasas desconocidas, o aún sin clasificar, (U), ver Handbook of Proteolytic Enzymes, A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner (eds), Academic Press (1998), en particular la parte de introducción general.

25 [0036] La actividad de la proteasa se puede medir utilizando cualquier ensayo, donde se emplea un sustrato, que incluye enlaces peptídicos relevantes para la especificidad de la proteasa en cuestión. El pH de ensayo y la temperatura de ensayo deben ser asimismo adaptadas a la proteasa en cuestión. Ejemplos de valores de pH de ensayo son pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12. Ejemplos de temperaturas de ensayo son 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90, o 95 °C. Ejemplos de sustratos de proteasa incluyen, pero no de forma limitativa, caseína, tal como caseína reticulada con azurina (caseína AZCL) y Protazyme AK.

[0037] No hay limitaciones en el origen de la proteasa de la invención y/o para el uso según la invención. Así, el término proteasa incluye no sólo proteasas naturales o de tipo salvaje obtenidas a partir de microorganismos de cualquier género, sino también cualquier mutante, variante, fragmento, etc. de las mismas que muestre actividad de proteasa, al igual que proteasas sintéticas, tales como proteasas transpuestas y proteasas de consenso. Tales proteasas modificadas genéticamente pueden ser preparadas como se conoce generalmente en la técnica, por ejemplo mediante mutagénesis de sitio dirigido, mediante PCR (utilizando un fragmento de PCR con la mutación deseada como uno de los cebadores en las reacciones PCR), o mediante mutagénesis aleatoria. La preparación de proteínas de consenso viene descrita por ejemplo en el documento EP 897985. La transposición de genes viene generalmente descrita por ejemplo en los documentos WO 95/22625 y WO 96/00343. La recombinación de genes de proteasa puede hacerse independientemente de la secuencia parental específica mediante transposición artificial como se describe en Ness, J. E. et al, en Nature Biotechnology, Vol. 20 (12), págs. 1251 1255, 2002. Los oligonucleótidos sintéticos degenerados en su secuencia de ADN para proporcionar la posibilidad de todos los aminoácidos presentes en el conjunto de proteasas parentales están diseñados y los genes son ensamblados según la referencia. La transposición puede llevarse a cabo para la secuencia de longitud total o sólo para parte de la secuencia y posteriormente ser combinada con el resto de los genes para dar una secuencia de longitud total.

[0038] En un aspecto, la proteasa es obtenible a partir de *Nocardiopsis*.

50 [0039] *Nocardiopsis* ha sido descrita por Meyer en 1976 (Meyer, 1976, Int J Syst Bacteriol, 26,487-493). *Nocardiopsis dassonvillei* es una de las especies de este género y es llamada de diversas maneras como *Nocardiopsis dassonvillei* subesp. *dassonvillei*, *Nocardiopsis antarctica* o incluso *Streptomyces flavidofuscus*. Preferiblemente, la proteasa es obtenible del género *Nocardiopsis*, más preferiblemente de *Nocardiopsis dassonvillei*, *Nocardiopsis alba* o *Nocardiopsis antarctica*, más preferiblemente de *Nocardiopsis dassonvillei* subesp. *dassonvillei*.

[0040] En otro aspecto, la proteasa es obtenible a partir de *Bacillus* o *Thermoascus*. Las proteasas obtenibles a partir de *Bacillus* son bien conocidas en la técnica. Las proteasas obtenibles a partir de *Thermoascus* vienen descritas en el documento WO 03/048353.

60 [0041] La expresión "obtenible de" como se utiliza en este caso en relación con una fuente determinada debe significar que el polipéptido codificado por la secuencia de ácidos nucleicos es producido por la fuente o por una célula recombinante (también llamada célula huésped) en la que está presente la secuencia de ácidos nucleicos de la fuente. En una forma de realización preferida, el polipéptido es secretado extracelularmente. Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, las proteasas de la presente invención pueden ser glicosiladas o pueden ser no glicosiladas. Además, las proteasas de la invención también pueden incluir

un residuo de metionina modificada inicial, en algunos casos como resultado de procesos mediados por huésped.

[0042] Las células huésped pueden ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, un procariota, o un microorganismo no unicelular, por ejemplo, un eucariota.

[0043] Las células huésped útiles son células bacterianas como bacterias Gram positivas incluyendo, pero no de forma limitativa, una célula de *Bacillus*, o una célula de *Streptomyces*, o células de bacterias productoras de ácido láctico; o bacterias Gram negativas como *E. coli* y *Pseudomonas sp.* Las bacterias productoras de ácido láctico incluyen, pero no de forma limitativa, especies de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Enterococcus*. Otras células huésped pueden ser células fúngicas (incluido el filo *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Zygomycota* (como define Hawksworth et al., en Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido) al igual que *Oomycota* (como se cita en Hawksworth et al., 1995, supra, página 171) y todos los hongos mitosporicos (Hawksworth et al., 1995, supra).

[0044] En un aspecto, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura" como se utiliza en este caso incluye levadura ascoesporógena (Endomicetales), levadura basidioesporógena y levadura de los Fungi Imperfecti (Blastomicetos). Ya que la clasificación de las levaduras puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura debe ser definida como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, F. A., Passmore, S. M., y Davenport, R. R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series nº 9, 1980). La célula de levadura huésped puede ser una *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o una célula de *Yarrowia*.

[0045] La célula huésped fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. "Hongo filamentoso" incluye todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (como define Hawksworth et al., 1995, supra). Los hongos filamentosos se caracterizan por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y el catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tal como *Saccharomyces cerevisiae* se produce mediante injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

[0046] Los ejemplos de células fúngicas filamentosas huésped son células de especies de, pero no de forma limitativa, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolypocladium* o *Trichoderma*.

[0047] En los métodos de producción de la presente invención, las células son cultivadas en un medio nutritivo adecuado para la producción de proteasa usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula puede ser cultivada mediante un cultivo en matraz de agitación, fermentación a pequeña o gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, de lote, de lote alimentado o fermentaciones en estado sólido) en el laboratorio o fermentadores industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten al polipéptido que se exprese y/o sea aislado. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Hay disponibles medios adecuados de proveedores comerciales o pueden ser preparados según redacciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Si la proteasa se segrega en el medio nutritivo, lo mismo se puede recuperar directamente del medio. Si la proteasa no se segrega, puede ser recuperada de lisatos celulares.

[0048] La proteasa resultante se puede recuperar a través de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la proteasa puede ser recuperada del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales que inducen, pero no de forma limitativa, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

[0049] Las proteasas de la presente invención pueden ser purificadas a través de numerosos procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no de forma limitativa, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofobia, cromatografía de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (ver, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editors, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

[0050] En un aspecto, la proteasa comprende una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la SEC ID nº 1 y variantes de la misma que tengan al menos un 70% de identidad con la SEC ID nº 1.

[0051] En otro aspecto, la proteasa comprende una secuencia de aminoácidos que se corresponde con las SEC ID nº 2 o 3 y variantes de las mismas que tengan al menos un 70% de identidades con la secuencia parental correspondiente.

[0052] El término "variante" pretende indicar un polipéptido que deriva a partir de la SEC ID nº 1 o 2 o 3 y que tiene actividad de proteasa. Normalmente, las variantes difieren de la proteasa parental (en este caso, proteasas con SEC ID nº 1 o 2 o 3) en uno o varios residuos de aminoácidos, que, por ejemplo, pueden haber sido añadidos o eliminados a partir de uno o ambos de los terminales N o C de la proteasa, insertados o eliminados en uno o varios

lugares en la secuencia de aminoácidos de la proteasa, o sustituidos por uno o varios residuos de aminoácidos dentro de, o en uno o ambos extremos de la secuencia de aminoácidos de la proteasa parental. Las variantes pueden ser ambas de origen natural (por ejemplo, variantes de polipéptidos codificadas por una variante alélica de un gen que es cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico) o ser creadas artificialmente por diferentes técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo PCR).

[0053] Una proteasa según la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad con la parte de péptido maduro de la SEC ID nº 1 o 2 o 3, por ejemplo, al menos aproximadamente un 70%. En formas de realización particulares, el grado de identidad con la SEC ID nº 1 o 2 o 3 o 4 es al menos aproximadamente 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o al menos 99%.

Para los fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos, está determinado por el programa "align" que es un alineamiento de Needleman-Wunsch (es decir un alineamiento global). El programa se usa para el alineamiento de polipéptidos, al igual que de secuencias de nucleótidos. Se usa la matriz de puntuación BLOSUM50 por defecto, con una penalización para el primer residuo de un hueco de -12 y las penalizaciones para otros residuos de un hueco de -2.

[0054] "Align" es parte de FASTA versión v20u6 (ver W. R. Pearson y D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis" PNAS 85:2444 2448, y W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA", Methods in Enzymology 183:63 98). Los alineamientos de proteína FASTA usan el algoritmo de Smith-Waterman sin limitación en el tamaño del hueco (ver "Smith-Waterman algorithm", T. F. Smith y M. S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195 197).

[0055] El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también puede ser determinado a través del método Clustal (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151 153) usando el software LASERGENE.TM. MEGALIGN.TM. (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiple: penalización de hueco de 10, y penalización de longitud de hueco de 10. Los parámetros de alineamiento de pareja son Ktuple=1, penalización de hueco=3, ventanas=5, y diagonales=5.

[0056] En un aspecto, la puesta en contacto de la proteasa con el mosto se lleva a cabo después del filtrado.

[0057] La temperatura en el filtrado es normalmente alrededor de 78 °C, por lo tanto puede ser necesario reducir la temperatura después del filtrado para permitir que la enzima funcione, reduciendo el coste de la temperatura adicional al proceso de elaboración y es por lo tanto ventajoso reducir la temperatura lo menos posible y preferiblemente no reducirla en absoluto.

[0058] La temperatura a la que se aplica la enzima es preferiblemente al menos 60°C, más preferiblemente al menos 70°C, más preferiblemente al menos 72°C, más preferiblemente al menos 74°C, más preferiblemente al menos 75°C, más preferiblemente al menos 76°C, más preferiblemente al menos 77°C, e incluso de forma más preferible al menos 78°C.

[0059] En un aspecto, la proteasa es una proteasa termoestable. La termoestabilidad es una medida de la capacidad de una enzima para retener su actividad a una temperatura más alta. Para fines de esta invención la termoestabilidad de una proteasa se mide utilizando un ensayo en un sustrato de proteasa sobre el que la proteasa es activa, como por ejemplo Protazyme AK®, como se describe en el ejemplo 3.

[0060] En un aspecto la proteasa retiene al menos el 70% actividad, como al menos el 75%, como al menos el 76%, como al menos el 77%, como al menos el 78%, como al menos el 79%, como al menos el 80%, como al menos el 81%, como al menos el 82%, como al menos el 83%, como al menos el 84%, como al menos el 85%, como al menos el 86%, como al menos el 87%, como al menos el 88%, como al menos el 89%, como al menos el 90%, como al menos el 91%, como al menos el 92%, como al menos el 93%, como al menos el 94%, como al menos el 95%, como al menos el 96%, como al menos el 97%, como al menos el 98%, como al menos el 99% tras la incubación durante 10 minutos a 70°C a pH 5.5 usando el sistema de tampón descrito en el ejemplo 3.

[0061] En un aspecto, la termoestabilidad puede ser medida también tras la incubación a 70°C durante un período de tiempo más largo tal como por ejemplo 60 minutos usando el ensayo descrito en el ejemplo 3. En tales casos, la proteasa retiene al menos el 20% de actividad, como al menos el 25%, como al menos el 30%, como al menos el 35%, como al menos el 40%, como al menos el 45%, como al menos el 50%, como al menos el 55%, como al menos el 60%, como al menos el 65%, como al menos el 70%, como al menos el 75%, como al menos el 80%, como al menos el 85%, como al menos el 90%, como al menos el 95%, como al menos el 97%, como al menos el 99% de su actividad a pH 5.5 usando el sistema de tampón descrito en el ejemplo 3.

[0062] En un aspecto, la puesta en contacto se lleva a cabo durante un periodo entre 10 min y 5 horas, preferiblemente entre 20 min y 3 horas, más preferiblemente entre 30 min y 2 horas y de la forma más preferible entre 30 min y 1 hora.

[0063] En un aspecto, el método de la invención lleva a una reducción de la neblina, cuando se compara con una cerveza fermentada de manera convencional.

[0064] Para cuantificar la cantidad de neblina en una bebida, se usa frecuentemente un turbidímetro, también llamado neblinómetro. En un turbidímetro se mide la cantidad de luz que se dispersa a un ángulo pre-descrito relativamente a la dirección del haz luminoso incidente. Las mediciones de turbidez son muy adecuadas para la medición de neblina formada como resultado de las interacciones proteína-polifenol.

[0065] Una "cerveza elaborada de forma convencional" se define como una cerveza que hecha a través de un método de elaboración donde la proteasa es añadida a la malta remojada durante la fase de trituration.

[0066] En otro aspecto, el método de la invención lleva a un uso disminuido de las ayudas de procesamiento usadas durante la elaboración y el almacenamiento para reducir la formación de neblina.

[0067] Una "ayuda de procesamiento" es un agente que se usa durante la elaboración y/o almacenamiento para reducir la formación de neblina. Las ayudas de procesamiento incluyen, pero de forma no limitativa, gel de sílice, PVPP, bentonita, etc.

[0068] En un aspecto, la reducción es 100 por ciento, lo que significa que no se usa ningún agente de procesamiento. En otro aspecto, la cerveza es producida sin filtración en sílice y preferiblemente sin filtración en sílice y PVPP.

[0069] En un aspecto, el método de la invención lleva a una cerveza con una estabilidad de espuma bien igual a o mayor que una cerveza fermentada de forma convencional.

[0070] La espuma se forma por el dióxido de carbono liberado debido a la liberación de presión durante la dispensación de cerveza. La espuma está hecha estable debido a la presencia de agentes activos de superficie como proteínas activas de espuma que se acumulan en la superficie de la burbuja y forman una piel elástica alrededor de la burbuja de gas. La estabilidad de la espuma de una cerveza se determina midiendo el tiempo necesario (en segundos) para que la espuma colapse sobre una distancia dada usando el método NIBEM (MEBAK 2.19.2). El método es conocido en la técnica (MEBAK 2.19.2., Schaumbestimmung nach NIBEM, Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnische Analysekommision (MEBAK), Selbstverlag der MEBAK, Freising Weihenstephan).

Ejemplos

Ejemplo 1: Papel de la proteasa de la SEC ID nº 1 en la estabilización coloidal de la cerveza cuando es añadida bien durante la trituration o bien a la cerveza final.

[0071] El objetivo era investigar si el uso de la proteasa anterior bien en la malta remojada o bien en la cerveza final muestra actividad proteolítica similar y si hubo alguna diferencia en la estabilidad coloidal.

[0072] La proteasa fue obtenida como se describe en el documento US5312748. La actividad proteolítica fue determinada por el bien conocido método de hemoglobina Anson, cfr. Journal of General Physiology, 22, 79-89 (1959). Una unidad Anson (AU) es la cantidad de enzima proteolítica que digiere hemoglobina a un valor de pH de 9.0 y a una temperatura de 25°C. Durante un tiempo de reacción de 10 minutos a tal velocidad inicial por minuto hay formada tal cantidad de productos de división que no pueden ser precipitados con ácido tridoroacético que estos productos de división dan el mismo color con reactivo de fenol como hace un miliequivalente de tirosina.

[0073] Se llevaron a cabo ensayos de trituration a escala de laboratorio con 100 % malta. La malta remojada fue tratada con la proteasa en una cantidad correspondiente a 5 mg de proteína enzimática pura (EP)/kg proteasa de malta (SEC ID nº 1) siguiendo un protocolo de trituration mostrado en la Tabla 1. El control también fue molido según el perfil mostrado sin añadir la proteasa.

Tabla 1: perfil de trituration

Tiempo (min)	Temperatura (°C)
0	52
30	52
40	62
70	62
80	72
110	72
116	78
131	20

[0074] El mosto (12 °P) fue fermentado (12 °C, 5 días, cepa de levadura W 35/70) y la neblina del mosto y la cerveza fue medida con un turbidímetro (Turbidímetro Hach modelo 2100 AN). Además el potencial de formación de neblina en la cerveza fermentada final fue medido forzando la formación de neblina con la adición de ácido tánico según un método publicado por Siebert 1997 (J. Ser. Soc. Brew. Chem. 55(2):73-78,1997).

[0075] Los resultados se muestran en la figura 1.

[0076] A partir del resultado, es evidente que la proteasa no mostró ninguna influencia en la turbidez en el mosto o cerveza, lo cual es sorprendente. Incluso la adición de ácido tánico no mostró ninguna diferencia, lo que indica que la estabilidad coloidal no puede ser mejorada añadiendo taninos a la malta remojada.

Ejemplo 2: Efecto de las proteasas en la estabilidad coloidal y la estabilidad de la espuma de la cerveza cuando son añadidas durante o después del filtrado pero antes del hervido del mosto.

[0077] El mosto fue recuperado de un proceso de trituración de decocción a escala industrial de malta pilsner light alemana 100% bien modificada convencional según el siguiente perfil: trituración a 62°C durante 20 min, aumento de la temperatura a 65°C (1°C/min), reposo a 65°C durante 15 min, el 20% de la malta remojada fue hervida durante 20 min y mezclada con la malta remojada principal mantenida a 65°C dando como resultado una temperatura de trituración de 72°C mantenida durante 30 min, el 20% de la malta remojada fue hervida y mezclada con la malta remojada principal mantenida a 72°C dando como resultado una temperatura de 78°C y el filtrado fue iniciado. Se añadió agua durante el lavado dando como resultado una proporción de malta y agua de 1:5.

[0078] El mosto fue diluido en Platón 12 y fue dividido en tres lotes. El mosto del lote A no estaba tratado con enzimas (control), el mosto del lote B fue incubado durante 2 horas a 70°C con 5 mg proteína enzimática/kg proteasa de malta de la SEC ID nº 1 que corresponde a 0.019 AU/kg de malta, y el mosto del lote C fue incubado durante 2 horas a 60°C con 5 mg proteína enzimática/kg malta de la proteasa específica de prolina Brewers Clarex obtenida a partir de DSM (Het Overloon 1 6411 TE Heerlen (NL)) que corresponde a 2.7 g Brewers Clarex/100L cerveza. Después de la finalización de las incubaciones enzimáticas, el mosto fue hervido (inactivación de enzima) durante una hora con lúpulos (8% α -acids). Los tres lotes de mosto pasaron por el mismo proceso de elaboración en un proceso de escala piloto. El mosto fue cubierto con 15×10^6 células/ml de un tipo de levadura que fermenta el fondo convencional (W 34 70"). La fermentación fue llevada a cabo a 12°C durante 140 horas y los tres lotes de cerveza fueron estabilizados con PVPP (15 g/hl). El embotellado de la cerveza en matraces de 0.5 l fue realizado manualmente.

[0079] La estabilidad coloidal de las muestras de cerveza resultantes fue determinada según el procedimiento MEBAK 2.15.2.1 (0°C/40°C/0°C). La formación de neblina fue medida en unidades EBC (European Brewery Convention) después de hasta 15 ciclos calientes. El tiempo de almacenamiento de una cerveza con énfasis en la estabilidad coloidal se puede estimar por el número de ciclos calientes a los que puede someterse una cerveza hasta que la medición de neblina excede 2.0 unidades EBC [un ciclo caliente corresponde a aproximadamente 25 días de almacenamiento].

Número de ciclos calientes	Unidades EBC		
	Lote A (control)	Lote B (SEC ID nº 1)	Lote C (Brewers Clarex)
0	0.6	0.3	0.3
1	0.8	0.4	0.3
2	0.8	0.4	0.4
3	1.1	0.4	0.3
4	1.4	0.4	0.4
5	1.7	0.4	0.4
6	1.9	0.4	0.4
7	2.2	0.4	0.4
8	2.6	0.4	0.6
9	ND	0.4	0.7
10	ND	0.3	0.9
11	ND	0.4	1.0
12	ND	0.4	1.3
13	ND	0.4	2.2
14	ND	0.4	ND
15	ND	0.4	ND

[0080] Los datos muestran que las muestras de cerveza tratadas con proteasa de la SEC ID Nº 1 (lote B) tienen la mejor estabilidad coloidal marcada de todas las muestras (lote A-C). Brewers Clarex (lote C) además estaba funcionando mejor que la muestra de control (lote A).

[0081] El tiempo de almacenamiento de los lotes fue estimado y es como se indica posteriormente.

	Lote A (control)	Lote B (SEC ID nº 1)	Lote C (Brewers Clarex)
Tiempo de vida de almacenamiento estimado (en días)	175	≥ 375	325

[0082] Los datos muestran que las muestras de cerveza tratadas con proteasa de la SEC ID nº 1 (lote B) tienen el máximo tiempo de almacenamiento de todas las muestras (lote A-C). Brewers Clarex (lote C) también tuvo un mejor tiempo de almacenamiento que la muestra de control (lote A).

[0083] La estabilidad de la espuma (NIBEM) fue determinada según el procedimiento MEBAK (2.19.2).

	Lote A (control)	Lote B (SEC ID nº 1)	Lote C (Brewers Clarex)
NIBEM (en segundos)	246	261	267

[0084] Los datos muestran que las muestras tratadas con proteasa de la SEC ID nº 1 y Brewers Clarex (lotes B y C) pueden ser descritos como que poseen buenas propiedades de estabilidad de espuma hasta una extensión mejor que en el control (lote A).

Ejemplo 3: Prueba para termoestabilidad de proteasas

[0085] La termoestabilidad de las proteasas de las SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 y SEC ID nº 3, y de la Neutrase® (disponible comercialmente por Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) fue analizada usando Protazyme AK® (Megazyme International Ireland Ltd, Wicklow, Irlanda) como sustrato. Alternativamente, también pueden usarse otros sustratos, si es necesario, siempre y cuando la proteasa en cuestión tenga actividad para el sustrato.

[0086] Las proteasas de la SEC ID nº 1, 2, 3 y la Neutrase fueron diluidas a 1mg/ml en un tampón de ensayo (100 mM ácido succínico, 100 mM HEPES, 100 mM CHES, 100 mM CABS, 1 mM CaCl₂, 150 mM KCl, 0.01% Tritón X-100, pH ajustado a 5.5 con NaOH). Las proteasas fueron luego preincubadas en i) hielo, ii) 10 min a 70°C. Una muestra en blanco (tampón de ensayo sin proteasa) fue hecha y pre-incubada de la misma manera. Se suspendieron tabletas de Protazyme AK en 0.01% Tritón X-100, una tableta en 2 ml. Para cada reacción, se mezcló una solución de 500 µl de Protazyme con un tampón de ensayo 500 µl (descrito anteriormente) en un tubo Eppendorf y se colocó en hielo. Para iniciar la reacción, se añadieron 20 µl proteasa al tubo y se incubó en un termomezclador Eppendorf a 70°C, 1400 r.p.m. durante 15 min. La reacción fue detenida colocando los tubos en hielo. Las muestras fueron centrifugadas en frío a 14000 g durante 3 min, y se midió el OD₅₉₀ en el sobrenadante. El valor OD₅₉₀ para las muestras en blanco fue sustraído de los valores correspondientes de las muestras tratadas con proteasa. La termoestabilidad de las proteasas fue determinada calculando la actividad porcentual de las muestras preincubadas a 70°C en comparación con las muestras incubadas en hielo (100%). Los resultados se muestran en la siguiente tabla

Tabla 1: Termoestabilidad de las proteasas

Proteasa	Incubación	% Actividad ^a
SEC ID nº 1	Hielo	100
	10 min a 70°C	88
SEC ID nº 2	Hielo	100
	10 min a 70°C	71
SEC ID nº 3	Hielo	100
	10 min a 70°C	93
Neutrase	Hielo	100
	10 min a 70°C	0

^a Exceptuando la Neutrase, los valores son un promedio de dos mediciones

[0087] A partir de la tabla anterior, está claro que las proteasas de la SEC ID nº 1, 2, y 3 retuvieron el 88, 71 y 93 por ciento de su actividad respectivamente a 70°C indicando que son termoestables. No obstante la Neutrase no retuvo nada de su actividad a 70°C indicando que no es termoestable.

Ejemplo 4: Papel de las proteasas de la SEC ID nº 1, 2, 3 y la Neutrase en la estabilización coloidal evaluada en un sistema de mosto.

[0088] Se investigó si las proteasas (SEC ID nº 1, 2, 3 y Neutrase) eran capaces de mejorar la estabilidad coloidal del mosto en comparación con un control como sigue:

[0089] El mosto fue recuperado de un proceso de trituración de infusión de malta modificada 100% convencional con el siguiente perfil de trituración: trituración a 54°C durante 30 min, aumento en la temperatura a 64°C (1°C/min), reposo a 64°C durante 60 min, aumento en la temperatura a 78°C (1°C/min), reposo a 78°C durante 10 min seguido del filtrado (proporción malta y agua en la trituración 1:4). Se añadió agua durante el lavado dando como resultado una proporción de malta y agua de 1:8.

[0090] El mosto fue incubado durante 1 hora a 76°C según la siguiente especificación:

- 1) control
- 2) 8.0 mg proteasa EP de la SEC ID nº 1 EP/L mosto
- 3) 8.0 mg proteasa EP de la SEC ID nº 2 EP/L mosto
- 4) 8.0 mg proteasa EP de la SEC ID nº 3 EP/L mosto
- 5) 8.0 mg EP Neutrase /L mosto

[0091] El mosto fue hervido durante 30 min después de las incubaciones para inactivar la enzima.

[0092] El nivel de neblina del mosto, el nitrógeno total y el nitrógeno de amino libre (FAN por sus siglas en inglés) fue analizado como sigue:

[0093] El nivel de neblina del mosto fue determinado mezclando 50 ml de mosto filtrado (filtrado en un filtro de fibra de vidrio Sartorius Minisart-GF) con 150 ml de agua en la cubeta y la neblina inicial fue medida (Neblina_{inicial}) en el neblinómetro (modelo: HZ 013, Lg-automatic ApS, DK) a un ángulo 90°C. La misma muestra fue luego introducida en el agitador magnético y se añadieron 2x 3.75 ml de solución de Brewtan C (200 mg Brewtan C (galotanino, Ajinomoto OmniChem, Belgium)/L agua). La solución fue incubada durante 40 min y la neblina final fue medida (Neblina_{final}). La neblina de mosto se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Neblina de mosto} = \text{Neblina}_{\text{final}} - \text{Neblina}_{\text{inicial}} \text{ (Ec. 1)}$$

[0094] Se analizó el nitrógeno total (Kjeldahl) según los análisis EBC. El nitrógeno de amino libre (FAN) fue determinado según el procedimiento MEBAK-II 2.9.4.11.

[0095] El resultado del análisis se muestra en la tabla siguiente:

Tabla 2: Papel de las proteasas en estabilización coloidal evaluada en un sistema de mosto

	Control	Proteasa de SEC ID nº 2	Proteasa de SEC ID nº 3	Proteasas de SEC ID nº 1	Neutrase
Neblina de mosto	9.3 ± 0.2	7.2 ± 0.0	2.7 ± 0.1	4.5 ± 0.0	10.6 ± 0.1
FAN (mg/L)	202.5 ± 0.7	206.5 ± 2.1	212.5 ± 0.7	207.0 ± 1.4	208.0 ± 0.0
Nitrógeno total (mg/Kg)	941.5 ± 22.5	929.0 ± 17.0	959.5 ± 15.5	980.0 ± 0.0	980.0 ± 13.0

[0096] A partir de los resultados anteriores es evidente que las proteasas de la SEC ID nº 1, 2, 3 afectan positivamente a la neblina del mosto, es decir éstas resultan en una reducción de la neblina del mosto cuando se compara con un control (sin tratamiento enzimático). La proteasa de la SEC ID nº 3 mostró el efecto máximo seguido de la proteasa de la SEC ID nº 1 y 2 en ese orden. La Neutrase afecta negativamente a la neblina del mosto.

[0097] Sin pretender imponer ninguna teoría, creemos que el efecto negativo de la Neutrase se debe a su falta de termoestabilidad.

[0098] El FAN (nitrógeno de amino libre por sus siglas en inglés) no pareció ser inmensamente afectado por el tratamiento con proteasa. La adición de la proteasa de la SEC ID nº 3 resultó en el mayor aumento en el nivel de FAN del mosto.

[0099] El nitrógeno total (N) fue medido por el método Kjeldahl (Tabla 2). No se pudo observar ninguna gran diferencia entre las muestras tratadas con proteasas y el mosto de control.

Ejemplo 5: Papel de las proteasas de la SEC ID nº 1, 2 y 3 en la estabilización coloidal evaluada en un sistema de cerveza.

[0100] Se investigó si las proteasas (SEC ID nº 1, 2 y 3) eran capaces de mejorar la estabilidad coloidal de la cerveza en comparación a un control como sigue:

[0101] El mosto fue recuperado de un proceso de trituración de decocción a escala industrial de malta pilsner light

alemana 100% bien modificada convencional según el siguiente perfil: trituración a 62°C durante 20 min, aumento de la temperatura a 65°C (1°C/min), reposo a 65°C durante 15 min, el 20% de la malta remojada fue hervido durante 20 min y mezclado con la malta remojada principal mantenida a 65°C dando como resultado una temperatura de trituración de 72°C mantenida durante 30 min, el 20% de la malta remojada fue hervido y mezclado con la malta remojada principal mantenida a 72°C dando como resultado una temperatura de 78°C y fue iniciado el filtrado. Se añadió agua durante el lavado dando como resultado una proporción de malta y agua de 1:5.

[0102] El mosto fue diluido en Platón 12 y fue dividido en 5 lotes y 1-5 fueron incubados durante 1 hora a 76°C con lo siguiente:

- 1) Proteasa de la SEC ID nº 3 (1.6 mg EP/L)
- 2) Proteasa de la SEC ID nº 1 (3.8 mg EP/L)
- 3) Proteasa de la SEC ID nº 2 (2.6 mg EP/L)
- 4) Control (sin enzima)
- 5) Control (cerveza completamente estabilizada: 15 g/L PVPP + 40 g/L gel de sílice)

[0103] Después de la finalización de las incubaciones enzimáticas, el mosto fue hervido (inactivación de enzima) durante una hora con lúpulos (8% α -acids). Los cinco lotes de mosto fueron sometidos al mismo proceso de elaboración en un proceso de escala piloto. El mosto fue cubierto con 15×10^6 células/ml de un tipo de levadura fermentadora de fondo convencional (W 34 70"). La fermentación fue llevada a cabo a 12°C durante 140 horas y los cinco lotes de cerveza fueron filtrados. El embotellado de la cerveza en matraces 0.5 l fue llevado a cabo manualmente.

[0104] El nitrógeno total del mosto y el FAN total del mosto fue analizado como se describe anteriormente. Los resultados se muestran a continuación.

Tabla 3: Nitrógeno total del mosto (mg/100 ml, de 12°P)

	Proteasa de SEC ID nº 3	Proteasa de SEC ID nº 1	Proteasa de SEC ID nº 2	Control	Control (completamente estabilizado después de fermentación)
Prueba A	105.6	104.7	105.5	104.0	104.4
Prueba B	93.5	105.6	100.0	94.6	94.4

Tabla 4: FAN del mosto (mq/100 mL, de 12°P)

	Proteasa de SEC ID nº 3	Proteasa de SEC ID nº 1	Proteasa de SEC ID nº 2	Control	Control (completamente estabilizado después de fermentación)
Prueba A	19.0	22.1	20.5	20.3	19.9
Prueba B	19.0	18.5	17.8	18.7	18.2

[0105] A partir de los resultados anteriores, el mosto con nitrógeno de amino libre de mosto (FAN) y el nitrógeno total no parecen verse afectados por el tratamiento enzimático.

[0106] La estabilidad coloidal de las muestras de cerveza resultantes fue determinada según el procedimiento MEBAK 2.15.2.1 (0°C/40°C/0°C). La formación de neblina fue medida en unidades EBC. El tiempo de almacenamiento de una cerveza con énfasis en la estabilidad coloidal se puede estimar por el número de ciclos calientes a los que una cerveza puede ser sometida hasta que la medición de neblina excede 2.0 unidades EBS. Un ciclo caliente corresponde aproximadamente a 25 días de almacenamiento. Los resultados se muestran a continuación:

Tabla 5: Resultados de estabilidad coloidal:

nº ciclos calientes	Proteasa de SEC ID nº 3	Proteasa de SEC ID nº 1	Proteasa de SEC ID nº 2	Control	Control (completamente estabilizado)
0	0.459	0.424	0.375	0.801	0.649
1	1.43	0.764	1.03	2.01	1.46
2	1.47	0.748	1.09	-	-
3	1.58	0.782	1.17	-	1.68
4	1.58	0.788	1.21	2.35	1.50
5	1.62	0.805	1.23	-	1.72

6	-	-	-	-	1.78
7	1.80	0.849	1.36	-	1.86
8	1.61	0.810	1.34	2.15	
9	1.87	0.871	1.54	2.41	
10	1.86	0.870	1.70	2.61	
11	2.04	0.914	1.92	2.97	

[0107] A partir de la Tabla 5, se demuestra que el tratamiento con proteasas de la SEC ID nº 1, 2, 3 en particular después del filtrado a 76°C tiene una mejor estabilidad coloidal que el control y que el control completamente estabilizado.

Ejemplo 6: Influencia de las proteasas en la calidad del mosto enfocadas a la composición de proteína y formación de neblina en el mosto cuando son añadidas en diferentes pasos del proceso.

[0108] Se estudió el impacto de las proteasas cuando se aplican en la trituration, al final de la trituration y después del filtrado en la calidad de mosto y la composición de proteína.

[0109] 1.5 kg de malta bien modificada fueron molidos con un molino Heger MM40 2-Roller (espacio de 0.8 mm), y triturado con 6 litros de agua (calidad de elaboración). El perfil de trituration fue 30 minutos a 52°C, 30 minutos a 62°C, 30 minutos a 72°C y 10 minutos a 78°C. La separación del mosto fue llevada a cabo en una cuba de filtrado. Después de recolectar el primer mosto se llevó a cabo el lavado usando 2 veces 3 litros de agua de elaboración a 76°C. El mosto fue hervido 20 min en condiciones atmosféricas. Se llevaron a cabo siete experimentos independientes y la proteasa de la SEC ID nº 1 fue añadida según el plano mostrado en la Tabla 6.

Tabla 6: Prueba de plano

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Prueba 5	Prueba 6	Prueba 7
Punto de adición	Trituración	Trituración	Mashout	Mashout	Mosto	Mosto	Ninguno
Dosificación enzimática	10 mg EP/Kg	50 mg EP/Kg	10 mg EP/Kg	50 mg EP/Kg	1.6 mg EP/L	8.0 mg EP/L	Ninguno

[0110] Las muestras de mosto fueron tomadas después del hervido y analizadas comprendiendo el siguiente análisis: nitrógeno total (Kjeldahl), nitrógeno de amino libre (FAN), neblina (turbidez) después de la adición de Brewtan C. La composición de proteína fue analizada también mediante el análisis de mosto SDS-PAGE (descrito en el ejemplo 7 a continuación). Todos los métodos fueron llevados a cabo según el análisis EBC excepto la adición de Brewtan C, que fue llevada a cabo según el procedimiento descrito en el ejemplo 4 anteriormente. Los resultados se muestran a continuación:

Tabla 7: Resultados de la medición de nitrógeno total usando el método Kjeldahl

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Prueba 5	Prueba 6	Prueba 7
Punto de adición	Trituración	Trituración	Mashout	Mashout	Mosto	Mosto	Ninguno
Dosificación enzimática	10 mg EP/Kg	50 mg EP/Kg	10 mg EP/Kg	50 mg EP/Kg	1.6 mg EP/L	8.0 mg EP/L	Ninguno
Kjeldahl	970	1287	996	1406	822	830	838
PRIK	16%	54%	19%	68%	-2%	-1%	0

[0111] Los resultados anteriores muestran que cualquier contacto de la proteasa con la malta remojada aumenta el nitrógeno total y por lo tanto cambia la calidad del mosto y de la cerveza mientras que el contacto de la proteasa con mosto no cambia el contenido de nitrógeno total del mosto.

El índice de liberación de proteína por Kjeldahl (PRIK por sus siglas en inglés) también fue calculado.

El PRIK, o índice de liberación de proteína por Kjeldahl, se define por la presente como la cantidad de proteína liberada sobre el control sin enzimas en el porcentaje del control, es decir $PRIK = ((\text{proteína de mosto Kjeldahl a partir de muestra con enzima}) - (\text{muestra de proteína de control Kjeldahl sin enzima})) \times 100 / (\text{muestra de proteína de control Kjeldahl sin enzima})$.

[0112] Así nuestra invención comprende un método, donde la cantidad de proteína en el mosto, definido como el PRIK conforme al ejemplo 6, es aumentado menos del 10%, es aumentado preferiblemente menos del 9%, es aumentado más preferiblemente menos del 8%, es aumentado más preferiblemente menos del 7%, es aumentado más preferiblemente menos del 6%, es aumentado más preferiblemente menos del 5%, es aumentado más preferiblemente menos del 4%, es aumentado más preferiblemente menos del 3%, es aumentado más preferiblemente menos del 2% y de la forma más preferible es aumentado menos del 1%.

Tabla 8: Resultados de la medición FAN

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Prueba 5	Prueba 6	Prueba 7
Punto de adición	Trituración	Trituración	Mashout	Mashout	Mosto	Mosto	Ninguno
Dosificación enzimática	10 mg EP/Kg	50 mg EP/Kg	10 mg EP/Kg	50 mg EP/Kg	1.6 mg EP/L	8.0 mg EP/L	Ninguno
FAN (mg/L)	198.9	217.7	212.2	257.4	189.7	192.8	174.2

[0113] Como se muestra en la medición de nitrógeno total anterior, el contacto de la malta remojada con la proteasa aumenta el nivel de FAN pero no a la misma extensión que el nitrógeno total. Esto indica que las proteínas se solubilizan cuando la proteasa es añadida a la malta remojada pero sólo son parcialmente hidrolizadas a péptidos o amino ácidos.

Tabla 9: Medición de la neblina del mosto hervido después del tratamiento con Brewtan C

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Prueba 5	Prueba 6	Prueba 7
Punto de adición	Trituración	Trituración	Mashout	Mashout	Mosto	Mosto	Ninguno
Dosificación enzimática	10 mg EP/Kg	50 mg EP/Kg	10 mg EP/Kg	50 mg EP/Kg	1.6 mg EP/L	8.0 mg EP/L	Ninguno
Turbidez	8.5	9.9	10.9	10.5	5.5	4.5	7.8
GATA	-9%	-27%	-40%	-35%	29%	42%	-

[0114] Donde el GATA (ensayo de turbidez con ácido gálico, por sus siglas en inglés) es la reducción en la turbidez en relación al control sin proteína como % del control.

[0115] Es decir $GATA = \frac{((\text{turbidez del control sin proteína}) - (\text{turbidez de la muestra}))}{(\text{turbidez del control sin proteína})} \times 100$

[0116] Los resultados de la medición de neblina indican que la adición de la proteasa al mosto elimina proteínas sensibles a la neblina mientras que cualquier contacto de la proteasa con malta remojada aumenta la cantidad total de nitrógeno y como consecuencia aumenta el potencial de formación de neblina.

Ejemplo 7: Análisis de las proteínas del mosto después del tratamiento con proteasas mediante análisis de mosto SDS-PAGE que es un método basado en electroforesis en gel de sulfato-poliacrilamida de dodecilo de sodio (SDS-PAGE).

[0117] El mosto obtenido después del tratamiento con proteasa como se menciona anteriormente en el ejemplo 6 fue analizado usando SDS-PAGE para entender los cambios cualitativos y cuantitativos en el perfil de la proteína, si los hay.

[0118] Se prepararon muestras para SDS-PAGE añadiendo 4x 30 µl de tampón de carga de proteína que contiene ditiotritol (DTT) (Fementas, #R0891) a 90 µl de muestra dando como resultado 1x tampón de carga de proteína (0.0626 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 0.01% azul de bromofenol, 10% glicerol, y 0.1 M DTT) seguido de un calentamiento a 85°C durante 3 min. Se añadieron 10 µl de las muestras a un 4-20% gel Criterion Stain Free Gel (BioRad) utilizando un tampón de aplicación Tris/glicina/SD (24 mM Tris, 0.2 M glicina, y 0.1% SDS). Se usó PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fementas, #SM0661) como marcador. El gel fue aplicado durante 15 min a 100V y luego a 180V durante aproximadamente 1 hora hasta que la parte frontal hubo alcanzado el fondo del gel. Las proteínas fueron visualizadas usando Criterion Stain Free Imager (Biorad, California, USA).

[0119] A partir del SDS-PAGE, las diferentes bandas proteicas de la muestra fueron cuantificadas utilizando el software Image Lab Software para el sistema Criterion Stain Free (BioRad).

[0120] 6 bandas proteicas, una después de otra, fueron identificadas para cada muestra utilizando mosto hervido como referencia.

[0121] La banda proteica 1 es la banda diferente situada a 40 kDa +/- 2 kDa. Las bandas proteicas 2, 3 y 4 son bandas diferentes situadas entre 15 y 10 kDa, donde la banda 2 es la más grande (a 15 kDa +/- 2 kDa), la banda 4 es la más pequeña (justo por encima de 10 kDa) y la banda 3 es la banda diferente entre la banda 2 y la banda 4. Las bandas proteicas 5 y 6 (las siguientes bandas diferentes con PM menor) se encuentran a 10 kDa y por debajo, de las cuales la banda 5 es la más grande (aprox. 10 kDa) y la banda 6 es la más pequeña (< 10 kDa).

[0122] El área de una banda proteínica fue marcada con una caja de manera que cubriera la banda entera. En algunos casos, las bandas eran tan fuertes que se superponían una a otra y aquí las bandas fueron divididas según los tamaños observados en la vía de referencia con mosto hervido.

[0123] La intensidad de las bandas fue calculada por el programa Image Lab Software Program. Para cada muestra, la intensidad de las bandas individuales fue comparada con la intensidad de la misma banda en la referencia (mosto

hervido) (Tabla 10). Además, la cantidad (%) de la banda proteica 2 fue calculada dividiendo la intensidad de la banda entre la suma de la intensidad de las bandas 1 a 6 (Tabla 11).

Tabla 10: Cantidad (%) de la banda 1, banda 2, banda 3 y bandas 4-6 en mosto tratado con proteasa después del hervido en comparación con las bandas correspondientes en el mosto hervido. Se añadió proteasa de la SEC ID nº 1 en dos concentraciones diferentes; i) baja (L) (1.6 mg EP/L para mosto y 10 mg EP/L para malta remojada) y ii) alta (H) (8 mg EP/L para mosto y 50 mg EP/L para malta remojada) en pasos diferentes de la elaboración (mosto, trituración, y mashout).

Muestra	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Bandas 4-6	Total
Mosto hervido (sin enzima)	100	100	100	100	100	100	100	100
Mosto (L)	87.2	41.2	103.5	137.0	109.7	112.17	120.9	101.1
Mosto (H)	84.1	14.0	71.8	88.7	178.1	118.7	119.6	92.2
Trituración (L)	101.6	47.4	117.3	175.7	142.3	143.5	158.8	129.2
Trituración (H)	123.7	27.3	116.9	207.4	436.6	402.4	307.2	215.1
Mashout (L)	113.1	51.7	108.3	165.02	146.7	135.2	148.9	123.7
Mashout (H)	122.6	40.6	106.8	220.0	277.3	277.8	242.9	178.7

Los números son el promedio de dos cuantificaciones

Tabla 11: Cantidad (%) de banda 2 en el mosto después del hervido en comparación con proteínas totales (banda proteica 1 a 6) cuando la proteasa de la SEC ID nº 1 fue añadida en dos concentraciones diferentes; i) baja (L) (1.6 mg EP/L para el mosto y 10 mg EP/L para la malta remojada) y ii) alta (H) (8 mg EP/L para el mosto y 50 mg EP/L para la malta remojada) en pasos diferentes de la elaboración (mosto, trituración, y mashout).

Muestra	Banda 2
Mosto dulce (sin enzima)	15.7
Mosto hervido (sin enzima)	15.5
Mosto - L	6.3
Mosto - H	2.4
Trituración (L)	5.8
Trituración (H)	2.0
Mashout (L)	6.5
Mashout (H)	3.7

Los números son el promedio de dos cuantificaciones

[0124] La adición de proteasa de la SEC ID nº 1 en una concentración baja y alta en pasos diferentes en el proceso de elaboración cambió el perfil total de la proteína. Comparando la intensidad de las bandas proteicas individuales a partir de las muestras tratadas de proteasa de la SEC ID nº 1 con mosto hervido sin enzima; el tratamiento del mosto o malta remojada con la proteasa reduce significativamente la banda proteica 2 (14.0-51.7% de intensidad de banda en el mosto hervido). No obstante, cuando la proteasa fue añadida a la malta remojada, las bandas proteicas 4-6 aumentaron significativamente hasta 307.2% en comparación con las bandas en el mosto hervido (100%). Además, la adición de proteasa al mosto resultó en una reducción de la cantidad de proteína total (92.2% de proteína total en el mosto hervido), mientras que la adición de proteasa a la malta remojada resultó en un aumento de la cantidad de proteína total (123.7-215.1% de proteína total en el mosto hervido).

[0125] Cuando se comparó la cantidad porcentual de banda proteica 2 a la cantidad total de proteína (banda 1 a 6) para cada muestra, el tratamiento de la malta remojada y el mosto con proteasa resultó en una reducción significativa en la banda 2 (2.0-6.5% de proteína total) en comparación con mosto dulce no tratado y con mosto hervido (15.5- 15.7% de proteína total) (Tabla 11).

[0126] Tres otras proteasas del ejemplo 4, la proteasa de la SEC ID nº 2, 3 y Neutrased, fueron evaluados para su degradación proteica en el mosto dulce. Los resultados se muestran a continuación:

Tabla 12: Cantidad (%) de la banda 1, banda 2, banda 3 y banda 4-6 en el mosto tratado con proteasas diferentes (8 mg EP/L) en comparación con las bandas correspondientes en el mosto hervido.

Muestra	Banda 1	Banda 2 (CPRA)	Banda 3	Bandas 4-6 (CLRA)	Total
Mosto hervido (sin	100	100	100	100	100

enzima)					
Proteasa de SEC ID n° 3	90.3	13.8	28.8	152.2	107.9
Proteasa de SEC ID n° 2	56.4	48.8	114.8	141.7	113.7
Proteasa de SEC ID n° 1	93.6	26.4	120.4	183.5	140.8
Neutrase	120.2	116.6	158.8	152.7	144.1

Los números son el promedio de dos cuantificaciones

5 [0127] Así nuestra invención comprende también un método, donde el CPRA está por debajo del 80% y el CLRA está por debajo del 200%, preferiblemente donde el CPRA está por debajo del 70% y el CLRA está por debajo del 200%, más preferiblemente donde el CPRA está por debajo del 60% y el CLRA está por debajo del 200%, y de la forma más preferible donde el CPRA está por debajo del 50% y el CLRA está por debajo del 200%.

10 Tabla 13: Cantidad (%) de banda 2 en comparación con el total (banda proteica 1 a 6) en el mosto tratado con proteasas (8 mg EP/L)

Muestra	Banda 2
Mosto hervido (sin enzima)	14.7
Proteasa SEC ID n° 3	1.9
Proteasa SEC ID n° 2	6.3
Proteasa SEC ID n° 1	2.8
Neutrase	11.9

Los números son el promedio de dos cuantificaciones

15 [0128] Tanto la proteasa de la SEC ID n° 3 y como de la SEC ID n° 2 degradaron la banda 2 hasta llegar al 13.8-48.8% de la banda correspondiente en el mosto hervido (Tabla 11). De la cantidad de proteínas totales, la banda 2 sólo representaba el 1.9-6.3% para la proteasa de la SEC ID n° 1, 2 y 3 en comparación con el 14.7% en el mosto hervido (Tabla 13). No se observó ningún gran efecto en la banda proteica 2 para la Neutrase (Tabla 12 y 13), que es probablemente debido a menos termoestabilidad (T-opt (pH) = 50 (pH 9)).

20 Listado de secuencias

[0129]

25 <110> Novozymes A/S

<120> Un método de elaboración

<130> 11567.204-WO

30 <160> 3

<170> PatentIn version 3.5

35 <210> 1
<211> 188
<212> PRT
<213> Nocardiosis sp.

40 <220>
<221> mat_peptide
<222> (1) .. (188)

<400> 1

ES 2 531 127 T3

Ala Asp Ile Ile Gly Gly Leu Ala Tyr Thr Met Gly Gly Arg Cys Ser
1 5 10 15

Val Gly Phe Ala Ala Thr Asn Ala Ala Gly Gln Pro Gly Phe Val Thr
20 25 30

Ala Gly His Cys Gly Arg Val Gly Thr Gln Val Thr Ile Gly Asn Gly
35 40 45

Arg Gly Val Phe Glu Gln Ser Val Phe Pro Gly Asn Asp Ala Ala Phe
50 55 60

Val Arg Gly Thr Ser Asn Phe Thr Leu Thr Asn Leu Val Ser Arg Tyr
65 70 75 80

Asn Thr Gly Gly Tyr Ala Thr Val Ala Gly His Asn Gln Ala Pro Ile
85 90 95

Gly Ser Ser Val Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly
100 105 110

Thr Ile Gln Ala Arg Gly Gln Ser Val Ser Tyr Pro Glu Gly Thr Val
115 120 125

Thr Asn Met Thr Arg Thr Thr Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly
130 135 140

Gly Ser Tyr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly
145 150 155 160

Ser Gly Asn Cys Arg Thr Gly Gly Thr Thr Phe Tyr Gln Glu Val Thr
165 170 175

Pro Met Val Asn Ser Trp Gly Val Arg Leu Arg Thr
180 185

<210> 2

5 <211> 274

<212> PRT

<213> Bacillus licheniformis

<220>

10 <221> mat_peptide

<222> (1) .. (274)

<400> 2

ES 2 531 127 T3

Ala	Gln	Thr	Val	Pro	Tyr	Gly	Ile	Pro	Leu	Ile	Lys	Ala	Asp	Lys	Val
1				5					10					15	
Gln	Ala	Gln	Gly	Phe	Lys	Gly	Ala	Asn	Val	Lys	Val	Ala	Val	Leu	Asp
			20					25					30		
Thr	Gly	Ile	Gln	Ala	Ser	His	Pro	Asp	Leu	Asn	Val	Val	Gly	Gly	Ala
		35					40					45			
Ser	Phe	Val	Ala	Gly	Glu	Ala	Tyr	Asn	Thr	Asp	Gly	Asn	Gly	His	Gly
	50					55					60				
Thr	His	Val	Ala	Gly	Thr	Val	Ala	Ala	Leu	Asp	Asn	Thr	Thr	Gly	Val
65					70					75					80
Leu	Gly	Val	Ala	Pro	Ser	Val	Ser	Leu	Tyr	Ala	Val	Lys	Val	Leu	Asn
				85					90					95	
Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Val	Ser	Gly	Ile	Glu	Trp
			100					105					110		
Ala	Thr	Thr	Asn	Gly	Met	Asp	Val	Ile	Asn	Met	Ser	Leu	Gly	Gly	Ala
			115				120					125			
Ser	Gly	Ser	Thr	Ala	Met	Lys	Gln	Ala	Val	Asp	Asn	Ala	Tyr	Ala	Arg
	130					135					140				

ES 2 531 127 T3

Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Ser Gly Asn
145 150 155 160

Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val
165 170 175

Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly
180 185 190

Ala Glu Leu Glu Val Met Ala Pro Gly Ala Gly Val Tyr Ser Thr Tyr
195 200 205

Pro Thr Asn Thr Tyr Ala Thr Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro
210 215 220

His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu
225 230 235 240

Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu
245 250 255

Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala
260 265 270

Ala Gln

<210> 3

<211> 178

5 <212> PRT

<213> Thermoascus aurantiacus

<220>

<221> mat_peptide

10 <222> (1) .. (178)

<400> 3

ES 2 531 127 T3

Arg	Thr	Arg	Ile	Ser	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Arg	Gln	Ser	Ala	Leu	Thr	1	5	10	15
Thr	Ala	Leu	Arg	Asn	Ala	Ala	Ser	Leu	Ala	Asn	Ala	Ala	Ala	Asp	Ala	20	25	30	
Ala	Gln	Ser	Gly	Ser	Ala	Ser	Lys	Phe	Ser	Glu	Tyr	Phe	Lys	Thr	Thr	35	40	45	
Ser	Ser	Ser	Thr	Arg	Gln	Thr	Val	Ala	Ala	Arg	Leu	Arg	Ala	Val	Ala	50	55	60	
Arg	Glu	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ala	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Asp	65	70	75	80
Asp	Pro	Tyr	Gly	Tyr	Cys	Ser	Ser	Asn	Val	Leu	Ala	Tyr	Thr	Leu	Pro	85	90	95	
Ser	Tyr	Asn	Ile	Ile	Ala	Asn	Cys	Asp	Ile	Phe	Tyr	Thr	Tyr	Leu	Pro	100	105	110	
Ala	Leu	Thr	Ser	Thr	Cys	His	Ala	Gln	Asp	Gln	Ala	Thr	Thr	Ala	Leu	115	120	125	
His	Glu	Phe	Thr	His	Ala	Pro	Gly	Val	Tyr	Ser	Pro	Gly	Thr	Asp	Asp	130	135	140	
Leu	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Gln	Ala	Ala	Met	Gly	Leu	Ser	Ser	Ser	Gln	Ala	145	150	155	160
Val	Met	Asn	Ala	Asp	Thr	Tyr	Ala	Leu	Tyr	Ala	Asn	Ala	Ile	Tyr	Leu	165	170	175	
Gly	Cys																		

REVINDICACIONES

1. Método de elaboración de una cerveza que comprende la adición de una proteasa termoestable a un mosto después del filtrado pero antes del hervido del mosto, donde termoestable significa que la actividad de la proteasa es al menos el 70% de la actividad de referencia cuando es evaluada según el siguiente método:
 - La proteasa es diluida a 1mg/ml en un tampón de ensayo que comprende 100 mM ácido succínico, 100 mM HEPES, 100 mM CHES, 100 mM CABS, 1 mM CaCl₂, 150 mM KCL, 0.01% Tritón X-100, pH ajustado a 5.5 con NaOH. La proteasa es entonces preincubada en i) hielo, ii) 10 min a 70°C. El sustrato para el que la proteasa tiene actividad es suspendido en 0.01% Tritón X-100. Para iniciar la reacción, se añaden 20 µl al tubo y se incuba en un termomezclador Eppendorf a 70°C, 1400 r.p.m. durante 15 min. La reacción se detiene colocando los tubos en hielo. Las muestras son centrifugadas en frío a 14000 g durante 3 min, y se mide el OD₅₉₀ en el sobrenadante. El valor OD₅₉₀ de las muestras en blanco es sustraído de los valores correspondientes de las muestras tratadas con proteasa. La termoestabilidad de la proteasa se determina calculando la actividad porcentual de las muestras preincubadas a 70° en comparación con la actividad de referencia, que es la actividad de la proteasa de las muestras incubadas en hielo.
2. Método según la reivindicación 1, donde la proteasa es obtenible a partir de *Nocardiopsis*, *Thermoascus* o *Bacillus*.
3. Método según la reivindicación 1, donde la proteasa comprende una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la SEC ID nº 1 o variantes de la misma que tengan al menos un 70% de identidad con la SEC ID nº 1.
4. Método según la reivindicación 1, donde la proteasa comprende una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la SEC ID nº 2 o variantes de la misma que tengan al menos un 70% identidad con la SEC ID nº 2.
5. Método según la reivindicación 1, donde la proteasa comprende una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la SEC ID nº 3 o variantes de la misma que tengan al menos el 70% de identidad con la SEC ID nº 3.
6. Método según la reivindicación 1, donde la adición de la proteasa termoestable al mosto se lleva a cabo a una temperatura de al menos 60°C.
7. Método según la reivindicación 1, donde la adición de la proteasa termoestable al mosto se lleva a cabo a una temperatura de al menos 70°C.
8. Método según la reivindicación 1, donde la adición de la proteasa termoestable al mosto se lleva a cabo a una temperatura de al menos 75°C.
9. Método según la reivindicación 1, donde la adición de la proteasa termoestable al mosto se lleva a cabo durante un periodo entre 10 min y 5 horas.
10. Método según la reivindicación 2, donde la proteasa es obtenible a partir de *N. dassonvillei*, *Thermoascus arantiacus* o *Bacillus licheniformis*.

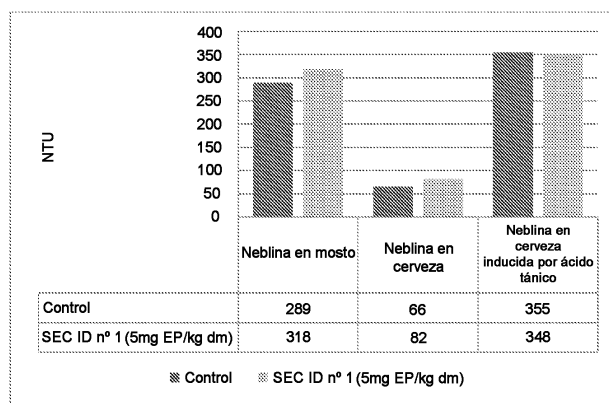


Figura 1