

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 726**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/28** (2006.01)

**C12C 5/00** (2006.01)

**C12C 7/047** (2006.01)

**C12N 9/44** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2010 E 10775833 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2499227**

54 Título: **Método de elaboración de cerveza**

30 Prioridad:

**13.11.2009 EP 09175967**

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

**03.07.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FREDERIKSEN, ANNE METTE BHATIA;  
BEIER, LARS y  
KREISZ, STEFAN**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 539 726 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 de cerveza

5 Campo de la invención

[0001] Esta invención se refiere a la elaboración de cerveza. Se refiere al uso de una combinación de una pululanasa, una alfa-amilasa y una alfa-amilasa maltogénica y/o una beta-amilasa para la elaboración de cerveza. También se refiere al uso de una alfa-amilasa maltogénica tolerante a la sacarosa para la elaboración de cerveza.

10 Antecedentes de la invención

[0002] Los procesos de elaboración son conocidos en la técnica. Éstos implican los pasos de malteado, maceración y fermentación/maduración. Brevemente; durante el malteado, se permite que los granos germinen y luego se secan y opcionalmente se tuestan. El proceso de malteado causa la activación de varias enzimas en el grano que pueden convertir el almidón en el grano en azúcar. Antes de la trituración, la malta se machaca para formar molienda, que se mezcla con agua para formar una malta remojada y luego se envía para la maceración. La maceración es el proceso de conversión del almidón en la malta remojada en azúcares fermentables y no fermentables. El proceso de maceración se conduce durante un periodo de tiempo a varias temperaturas para activar las enzimas endógenas responsables de la degradación de proteínas y carbohidratos. Las enzimas exógenas también pueden añadirse durante el proceso de trituración para acelerar las reacciones y permitir un mejor control del proceso de elaboración. Hacia el final de la maceración, la temperatura se puede elevar hasta aproximadamente 75 °C (165-170 °F) (conocido como un trasvase). Después de la maceración, el líquido resultante es exprimido de los granos en un proceso conocido como filtración. El líquido resultante de la filtración se conoce como mosto. El mosto que es rico en azúcares es luego hervido con lúpulo, enfriado y entonces fermentado en etanol que usa levadura. La cerveza resultante se acondiciona desde una semana hasta varios meses y luego se envasa.

[0003] Aunque tradicionalmente la cerveza ha sido elaborada sólo a partir de malta de cebada, lúpulos y agua; la malta es una materia prima costosa porque requiere granos de calidad superior, agua para la germinación y energía para el secado/tostado. Generalmente en la molienda también se incluyen alrededor del 25-30% de granos no malteados, también llamados aditivos, tales como maíz, arroz, sorgo y trigo, almidón refinado o carbohidratos fácilmente fermentables tales como azúcar o jarabes. Los aditivos se usan principalmente porque están fácilmente disponibles y proporcionan carbohidratos a un coste inferior del que está disponible la malta de cebada. También se pueden conseguir otras ventajas, por ejemplo estabilidad física mejorada, calidades de refrigeración superiores y mejor brillantez. No obstante cuando se usan aditivos con temperaturas de gelatinización superiores, por ejemplo maíz o arroz, deben cocinarse y gelatinizarse en un "horno de cereales" independiente antes de ser mezclados en la trituración de la malta antes de la sacarificación. Así, mientras el uso de aditivos reduce los costes de precio de las materias primas, requiere una inversión adicional en el horno de cereal al igual que un coste adicional de energía para el calentamiento del aditivo. Estos requisitos de coste adicional han desalentado a cerveceros a la hora de aumentar la proporción de aditivos y también usar diferentes aditivos de elección en su proceso de elaboración.

[0004] Últimamente, hay un cambio espectacular en los precios de las materias primas provocado por un aumento en la demanda de granos, la escasez de agua global, el cambio de modelos climáticos etc. Esto ha obligado a la industria cervecera a enfocarse en la eficiencia en la producción al igual que en el ahorro de materias primas.

[0005] El documento WO 2007/113292 describe un proceso para la producción de mosto y cerveza a partir de una molienda de aditivo de almidón granulado macerada a una temperatura inferior a la temperatura de gelatinización de dicho almidón. El documento WO 2005/121305 describe un proceso para la producción de un mosto adecuado para la fermentación en una cerveza "baja en carbohidratos" o súper atenuada.

[0006] El documento WO 2004/011591 describe un proceso para la producción de mosto y cerveza a partir de molienda macerada a alta temperatura.

[0007] El documento US 5 082 781 describe la producción de una beta-amilasa termofílica obtenida de Clostridium thermosulfurogenes en gran escala, especialmente a partir de microorganismos genéticamente modificados, por ejemplo, Bacillus subtilis.

[0008] Existe una necesidad de procesos mejorados en la elaboración que reduzca los costes y/o aumente la eficiencia de producción.

60 Resumen de la invención

[0009] Los inventores han descubierto sorprendentemente que una combinación de una pululanasa, una alfa-amilasa y bien una alfa-amilasa maltogénica o una beta-amilasa o ambas puede resultar en rendimientos de producción mejorados. Facilita la inclusión de un porcentaje superior de aditivos durante la elaboración; mejora el perfil de sacarificación y también da como resultado una cerveza esencialmente similar a la cerveza fermentada de

manera tradicional.

5 [0010] Los inventores también han descubierto sorprendentemente que cuando se usa tal combinación, hay mayores ahorros de energía debido a que los procesos pueden hacerse a una temperatura inferior y se puede prescindir del horneado del cereal.

[0011] Los inventores también han descubierto sorprendentemente que la eficiencia de producción aumenta y los costes disminuyen cuando la alfa-amilasa maltogénica también es tolerante a la sacarosa.

10 [0012] Así en un aspecto, la invención se refiere a un método de maceración que comprende:

a) proporcionar una molienda que comprende malta y aditivo; y

b) contactar la molienda con

15 i) una pululanasa;

ii) una alfa-amilasa; y

iii) una alfa-amilasa maltogénica y/o una beta-amilasa para hacer un mosto.

[0013] En un aspecto, el mosto se convierte en cerveza.

20 [0014] En un aspecto, la invención se refiere al uso de una pululanasa, una alfa-amilasa y una alfa-amilasa maltogénica y/o una beta-amilasa en la elaboración.

[0015] En un aspecto, la amilasa maltogénica es una amilasa maltogénica con al menos el 70% de identidad a la SEC ID nº 1.

25

[0016] En otro aspecto, la alfa-amilasa tiene al menos un 70% de identidad a la SEC ID nº 2.

[0017] En un aspecto, la pululanasa tiene al menos un 70% de identidad a la SEC ID nº 3.

30 [0018] En un aspecto, la beta-amilasa tiene al menos un 70% de identidad a la SEC ID nº 4.

[0019] En otro aspecto, la amilasa maltogénica tiene al menos un 10% más de tolerancia a la sacarosa que la amilasa denominada en la SEC ID nº 1.

35 [0020] En un aspecto, la amilasa maltogénica tiene sustituciones en posiciones específicas cuando se compara con la amilasa denominada en la SEC ID nº 1.

[0021] En un aspecto, la pululanasa es termoestable.

40 [0022] En otro aspecto, la beta-amilasa es termoestable.

[0023] En un aspecto, la molienda comprende un 30-80% de malta y un 30-80% de aditivo.

45 [0024] En otro aspecto, el aditivo incluye aditivos que tienen una temperatura de gelatinización superior al almidón de malta, por ejemplo, pero no se limitan al maíz y arroz.

Descripción detallada de la invención

50 [0025] En un aspecto, la invención se refiere a un método de maceración que comprende:

a) proporcionar una molienda que comprende malta y aditivo; y

b) contactar la molienda con

i) una pululanasa;

55 ii) una alfa-amilasa; y

iii) una alfa-amilasa maltogénica y/o una beta-amilasa para hacer un mosto.

60 [0026] El término "molienda" se entiende como el almidón o azúcar que contiene el material que es la base para la producción de cerveza, por ejemplo, pero no se limita a malta de cebada y el aditivo.

[0027] El término "malta" se entiende como cualquier grano de cereal malteado, en particular, cebada.

65 [0028] El término "gelatinización de almidón" se entiende como la transición irreversible de trastorno del orden que sufre el almidón cuando se calienta en presencia de agua. La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) en una técnica que se puede emplear para el estudio del proceso gradual de gelatinización de almidón que describe las temperaturas inicial y de valor máximo ( $T_o$  &  $T_p$ ) de gelatinización de almidón.

- [0029] El término "temperatura de gelatinización inicial ( $T_o$ )" se entiende como la temperatura a la que empieza la gelatinización.
- 5 [0030] El término "temperatura de gelatinización de valor máximo ( $T_p$ )" se entiende como la temperatura a un valor máximo endotérmico.
- [0031] El término "temperatura de gelatinización final ( $T_c$ )" se entiende como la temperatura a la que ha finalizado la gelatinización.
- 10 [0032] El término "aditivo" se entiende como esa parte de la molienda que no es malta. El aditivo puede ser cualquier material vegetal rico en almidón tal como, pero no limitado a, maíz, arroz, sorgo y trigo. Los aditivos preferidos para la invención incluyen aditivos donde el almidón tiene una temperatura de gelatinización inicial, de valor máximo y final ( $T_o$ ,  $T_p$ ,  $T_c$ ) más alta que la cebada o malta, de forma más preferible más de 5 °C superior al almidón de malta. Los aditivos se pueden gelatinizar antes de la maceración o se pueden añadir como tal a la molienda.
- 15 [0033] En un aspecto, los aditivos no son gelatinizados antes de la maceración.
- [0034] El término "malta remojada" se entiende como un almidón que contiene lodo de la molienda que comprende malta de cebada molida, grano no malteado molido, otro almidón que contiene material, o una combinación de los mismos, a remojo en el agua para hacer mosto. La "trituration" es el proceso de conversión del almidón en malta remojada en azúcares fermentables y no fermentables.
- 20 [0035] El término "mosto" se entiende como el escurrido del licor no fermentado siguiente a la extracción de la molienda durante la maceración.
- 25 [0036] Una "alfa-amilasa maltogénica" se entiende como una enzima clasificada en EC 3.2.1.133. La actividad enzimática no requiere un final no-reducido en el sustrato y la actividad enzimática primaria produce la degradación de amilopectina y amilosa en maltosa y maltodextrinas más largas. Es capaz de hidrolizar amilosa y amilopectina en maltosa en la configuración alfa.
- 30 [0037] Como se utiliza por la presente el término "tolerancia a la sacarosa" se entiende como el % de actividad residual de alfa-amilasa de una enzima incubada durante 15 min a 60°C en un sistema tampón (pH 5,0) que comprende un 10% de sacarosa. El 100% de tolerancia a la sacarosa se define como la actividad residual de alfa-amilasa de una enzima obtenida cuando no se añade ninguna sacarosa al sistema de tampón.
- 35 [0038] Se puede usar maquinaria convencional, equipamientos y materiales durante la maceración. La molienda se mezcla con agua antes de la maceración. El agua, antes de ser añadida a la molienda, puede ser preferiblemente precalentada para que la malta remojada alcance la temperatura de malta remojada deseada en el momento de la formación de la malta remojada. Si la temperatura de la malta remojada formada es inferior a la temperatura de maceración deseada, preferiblemente se suministra calor adicional para lograr la temperatura de proceso deseada. Preferiblemente, la temperatura de trituración deseada se logra en el intervalo de 15 minutos, o de forma más preferible en el intervalo de 10 minutos, tal como en el intervalo de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 minutos o incluso de forma más preferible en el intervalo de 1 minuto después de la formación de la malta remojada, o de la forma más preferible la temperatura de trituración deseada se logra en la formación de la malta remojada. El perfil de temperatura del proceso de maceración puede ser un perfil de un proceso de maceración convencional donde las temperaturas están fijadas para conseguir la degradación óptima de la sustancia seca de la molienda por las enzimas de malta.
- 40 [0039] La malta se deriva preferiblemente de uno o más de los granos seleccionados de la lista que comprende maíz, cebada, trigo, centeno, sorgo, mijo y arroz. Preferiblemente, la malta es malta de cebada.
- 45 [0040] La molienda comprende preferiblemente del 0,5% al 99%, preferiblemente del 1% al 95%, de forma más preferible del 5% al 90%, de forma más preferible del 10% al 85%, de forma más aún preferible del 30% al 80% de grano malteado, de la forma más preferible del 30% al 60% e incluso de la forma más preferible del 30% al 50%. Además del grano malteado, la molienda puede preferiblemente comprender aditivos tales como maíz no malteado, u otro grano no malteado, tal como cebada, trigo, centeno, avena, maíz, arroz, sorgo en grano, mijo y/o sorgo, o almidón crudo y/o refinado y/o azúcar que contiene material derivado de plantas como trigo, centeno, avena, maíz, arroz, sorgo en grano, mijo, sorgo, patata, batata, mandioca, tapioca, sagú, plátano, remolacha azucarera y/o azúcar de caña. Los aditivos se pueden obtener de tubérculos, raíces, tallos, hojas, legumbres, cereales y/o grano entero.
- 50 [0041] Preferiblemente estos aditivos tienen una temperatura de gelatinización alta. Más particularmente, estos aditivos tienen una temperatura de gelatinización inicial alta.
- 55 [0042] Es preferible el aditivo obtenido de maíz y/o arroz, más preferiblemente el aditivo es maíz. La trituración preferiblemente comprende del 1% al 80%, preferiblemente del 5% al 80%, de forma más preferible del 10% al 80%, y de forma aún más preferible del 30 al 80% de aditivo de almidón, de la forma más preferible del 30 al 60% e incluso de la forma más preferible del 40 al 60%.
- 60 [0043] El término "malta remojada" se entiende como un almidón que contiene lodo de la molienda que comprende malta de cebada molida, grano no malteado molido, otro almidón que contiene material, o una combinación de los mismos, a remojo en el agua para hacer mosto. La "trituration" es el proceso de conversión del almidón en malta remojada en azúcares fermentables y no fermentables.
- 65 [0044] El término "mosto" se entiende como el escurrido del licor no fermentado siguiente a la extracción de la molienda durante la maceración.
- [0045] Una "alfa-amilasa maltogénica" se entiende como una enzima clasificada en EC 3.2.1.133. La actividad enzimática no requiere un final no-reducido en el sustrato y la actividad enzimática primaria produce la degradación de amilopectina y amilosa en maltosa y maltodextrinas más largas. Es capaz de hidrolizar amilosa y amilopectina en maltosa en la configuración alfa.
- [0046] Como se utiliza por la presente el término "tolerancia a la sacarosa" se entiende como el % de actividad residual de alfa-amilasa de una enzima incubada durante 15 min a 60°C en un sistema tampón (pH 5,0) que comprende un 10% de sacarosa. El 100% de tolerancia a la sacarosa se define como la actividad residual de alfa-amilasa de una enzima obtenida cuando no se añade ninguna sacarosa al sistema de tampón.
- [0047] Se puede usar maquinaria convencional, equipamientos y materiales durante la maceración. La molienda se mezcla con agua antes de la maceración. El agua, antes de ser añadida a la molienda, puede ser preferiblemente precalentada para que la malta remojada alcance la temperatura de malta remojada deseada en el momento de la formación de la malta remojada. Si la temperatura de la malta remojada formada es inferior a la temperatura de maceración deseada, preferiblemente se suministra calor adicional para lograr la temperatura de proceso deseada. Preferiblemente, la temperatura de trituración deseada se logra en el intervalo de 15 minutos, o de forma más preferible en el intervalo de 10 minutos, tal como en el intervalo de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 minutos o incluso de forma más preferible en el intervalo de 1 minuto después de la formación de la malta remojada, o de la forma más preferible la temperatura de trituración deseada se logra en la formación de la malta remojada. El perfil de temperatura del proceso de maceración puede ser un perfil de un proceso de maceración convencional donde las temperaturas están fijadas para conseguir la degradación óptima de la sustancia seca de la molienda por las enzimas de malta.
- [0048] La malta se deriva preferiblemente de uno o más de los granos seleccionados de la lista que comprende maíz, cebada, trigo, centeno, sorgo, mijo y arroz. Preferiblemente, la malta es malta de cebada.
- [0049] La molienda comprende preferiblemente del 0,5% al 99%, preferiblemente del 1% al 95%, de forma más preferible del 5% al 90%, de forma más preferible del 10% al 85%, de forma más aún preferible del 30% al 80% de grano malteado, de la forma más preferible del 30% al 60% e incluso de la forma más preferible del 30% al 50%. Además del grano malteado, la molienda puede preferiblemente comprender aditivos tales como maíz no malteado, u otro grano no malteado, tal como cebada, trigo, centeno, avena, maíz, arroz, sorgo en grano, mijo y/o sorgo, o almidón crudo y/o refinado y/o azúcar que contiene material derivado de plantas como trigo, centeno, avena, maíz, arroz, sorgo en grano, mijo, sorgo, patata, batata, mandioca, tapioca, sagú, plátano, remolacha azucarera y/o azúcar de caña. Los aditivos se pueden obtener de tubérculos, raíces, tallos, hojas, legumbres, cereales y/o grano entero.
- [0050] Preferiblemente estos aditivos tienen una temperatura de gelatinización alta. Más particularmente, estos aditivos tienen una temperatura de gelatinización inicial alta.

[0042] En un aspecto el aditivo es una mezcla que comprende tanto aditivos de temperatura de gelatinización altos como bajos.

[0043] Cuando una solución acuosa de gránulos de almidón se calienta, los gránulos se hinchan para formar una pasta. Este proceso se llama "gelatinización". La temperatura a la que ocurre la gelatinización se llama "temperatura de gelatinización". Debido a la compleja naturaleza del almidón en los aditivos y también a las condiciones durante la maceración, la gelatinización en realidad ocurre en un rango de temperatura particular. El rango de temperatura de gelatinización puede caracterizarse así por la "temperatura de gelatinización inicial", la "temperatura de gelatinización de valor máximo" y la "temperatura de gelatinización final". Por ejemplo, para el almidón de maíz, la temperatura de gelatinización inicial es aproximadamente 62°C (valor máximo: 67°C, final: 72°C) y para el almidón de arroz la temperatura de gelatinización inicial es aproximadamente 68°C (valor máximo: 74.5 °C, final: 78°C) (Starch, 2ª ed. Industrial microscopy of starch por Eileen Maywald Snyder). La temperatura de gelatinización inicial puede variar según la especie de la planta, la variedad particular de la especie de la planta al igual que con las condiciones de crecimiento.

[0044] El aditivo también puede comprender carbohidratos fácilmente fermentables tales como azúcares o jarabes y se pueden añadir a la malta remojada antes, durante o después del proceso de maceración de la invención pero se añade preferiblemente después del proceso de maceración.

[0045] Antes de la formación de la malta remojada, la malta y/o el aditivo es preferiblemente molido y de forma más preferible molido en seco o mojado.

[0046] Las enzimas se pueden añadir como composiciones enzimáticas. Pueden consistir en una enzima o más de una enzima o más de una composición enzimática. La composición enzimática, además de la(s) enzima(s), también puede contener al menos otra sustancia, por ejemplo pero no limitado a, tampón, surfactantes etc. Las composiciones enzimáticas pueden ser de cualquier forma reconocida en la técnica, por ejemplo, sólida, líquida, emulsión, gel, o pasta. Tales formas son conocidas por el experto en la técnica. En un aspecto se puede añadir más de una composición enzimática, cada una contiene enzimas diferentes. En otro aspecto, se puede añadir una composición enzimática que contiene todas las enzimas necesarias. En otro aspecto, se puede añadir una composición enzimática que contiene unas pocas de las enzimas y al menos otra composición que contiene algunas o todas las enzimas restantes.

[0047] En un aspecto, se suministra exógenamente una composición enzimática que comprende una alfa-amilasa, una pululanasa, una alfa-amilasa maltogénica y/o una beta-amilasa y se puede añadir a los ingredientes de trituración, por ejemplo el agua o la molienda, antes, durante o después de la formación de la malta remojada, o en cualquier momento durante la maceración.

[0048] Durante el proceso de maceración, el almidón extraído de la molienda se hidroliza gradualmente en azúcares fermentables y dextrinas más pequeñas. Preferiblemente la malta remojada es negativa en almidón en la prueba de yodo, antes de extraer el mosto. La maceración se finaliza por el trasvase a una temperatura de 70°C o más, preferiblemente de al menos 71 °C, de al menos 72°C, de al menos 73°C, de al menos 74°C, de al menos 75°C, de al menos 76°C, de al menos 77°C, de al menos 78°C, mínimo de 79°C, de al menos 80°C y de forma más preferible de al menos 81°C o incluso de al menos 82°C o más.

[0049] La obtención del mosto a partir de la malta remojada incluye normalmente exprimir el mosto a partir de los granos consumidos, es decir el grano insoluble y material de cáscara que forma parte de molienda. Puede dejarse correr agua caliente a través de los granos consumidos para enjuagar, o asperjar, cualquier extracto restante de la molienda. Preferiblemente, la recuperación del extracto es de al menos el 80%, preferiblemente de al menos el 85%, de al menos el 90%. El mosto se puede utilizar como es, o se puede concentrar y/o secar.

[0050] El mosto también se puede procesar para usarse como jarabe. También se puede usar para producir bebidas no alcohólicas. Estos procesos son conocidos por un experto en la técnica.

[0051] El mosto también se puede fermentar en cerveza. Los tipos de cerveza preferidos comprenden ales, ales fuertes, cervezas negras robustas, ales tipo porter, lagers, cervezas amargas, cervezas de exportación, licores de malta, cerveza happoushu, cerveza de alta graduación, cerveza de baja graduación, cerveza baja en calorías o cerveza light. La fermentación del mosto también puede incluir cubrir el mosto con un lodo de levadura que comprende levadura fresca, es decir levadura no usada previamente 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. tal como *S. cerevisiae* y *S. uvarum*, incluyendo variantes producidas naturalmente o artificialmente de estos organismos. Los métodos para la fermentación de mosto para la producción de cerveza son conocidos por el experto en la técnica. Se puede añadir hidrogel de sílice al mosto fermentado para aumentar la estabilidad coloidal de la cerveza. El proceso puede incluir además la adición de diatomita al mosto fermentado y el filtrado para dejar la cerveza luminosa.

## Enzimas

## Alfa-amilasa maltogénica (EC 3.2.1.133)

5 [0052] La alfa-amilasa maltogénica es una enzima clasificada en EC 3.2.1.133. La actividad enzimática no requiere un final no-reducido en el sustrato y la actividad enzimática primaria produce la degradación de la amilopectina y la amilosa en maltosa y maltodextrinas más largas. Es capaz de hidrolizar amilosa y amilopectina en maltosa en la configuración alfa.

10 [0053] Ejemplos de amilasas maltogénicas incluyen, pero no se limitan a, la amilasa Novamyl® disponible de Novozymes A/S.

[0054] Una alfa-amilasa maltogénica particularmente preferida es la amilasa maltogénica de la SEC ID nº 1.

15 [0055] En un aspecto de la invención la alfa-amilasa maltogénica tiene al menos un 70% de identidad, tal como al menos un 75%, tal como al menos un 80%, tal como al menos un 85%, tal como al menos un 86%, tal como al menos un 87%, tal como al menos un 88%, tal como al menos un 89%, tal como al menos un 90%, tal como al menos un 91%, tal como al menos un 92%, tal como al menos un 93%, tal como al menos un 94%, tal como al menos un 95%, tal como al menos un 96%, tal como al menos un 97%, tal como al menos un 98%, tal como al menos un 99% o incluso un 100% de identidad a la secuencia mostrada en la SEC ID nº 1.

20 [0056] El término "identidad" es la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos. Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se implementa en el programa de Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends in Genetics 16: 276-277), preferiblemente versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de gap de 10, penalización por extensión de gap de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). La producción de Needle etiquetada "identidad más larga" (obtenida utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{(Residuos idénticos x 100) / (Longitud de alineamiento - Número total de gaps en alineamiento)}$$

35 [0057] En un aspecto, la alfa-amilasa maltogénica tiene mutaciones de aminoácido en una o varias posiciones específicas en la SEC ID. nº 1. Por ejemplo, las mutaciones pueden estar al menos en una o varias posiciones Y89F, P191S, D261 G, T288P, W93F, F194Y, Y360F o Y360 N. La nomenclatura usada por la presente para la definición de mutaciones es esencialmente como se describe en el documento WO 92/05249. Así Y89F indica una sustitución del aminoácido Y (Tyr) en la posición 89 con el aminoácido F (Phe). Los métodos para la realización de estas mutaciones son conocidos por un experto en la técnica.

40 [0058] En un aspecto la alfa-amilasa maltogénica tiene mutaciones en Y89F, P191S, D261G y T288P.

[0059] En otro aspecto, la alfa-amilasa maltogénica tiene mutaciones adicionales al menos en W93F, F194Y Y360F o Y360N.

45 [0060] En un aspecto la alfa-amilasa maltogénica tiene mutaciones en Y89F, W93F, P191 S, D261G y T288P.

[0061] En otro aspecto la alfa-amilasa maltogénica tiene mutaciones en Y89F, P191S, F194Y, D261G y T288P.

50 [0062] En un aspecto la alfa-amilasa maltogénica tiene mutaciones en Y89F, P191S, D261G, T288P y Y360F.

[0063] En otro aspecto la alfa-amilasa maltogénica tiene mutaciones en Y89F, P191S, D261G, T288P y Y360N.

55 [0064] En un aspecto, la alfa-amilasa maltogénica tiene al menos un 10% tal como al menos un 15% tal como al menos un 20% tal como al menos un 25% o tal como al menos un 30% o al menos un 35% o al menos un 40% o al menos un 45% o al menos un 50% o al menos un 55% o al menos un 60% o al menos un 65% o al menos un 70% o al menos un 75% más de tolerancia a la sacarosa que la alfa-amilasa maltogénica de la SEC ID nº 1.

[0065] La tolerancia a la sacarosa se determina utilizando el método dado en el ejemplo 5.

60 [0066] En un aspecto, la alfa-amilasa maltogénica es termoestable.

[0067] En otro aspecto, la alfa-amilasa maltogénica tiene al menos un 10% o al menos un 15 % o al menos un 20 % o al menos un 25 % o al menos un 30 % o al menos un 35% o al menos un 40% o al menos un 45% o al menos un 50% o al menos un 55% o al menos un 60% o al menos un 65% o al menos un 70% o al menos un 75% más termo estabilidad que la alfa-amilasa maltogénica de la SEC ID nº 1.

[0068] La termoestabilidad de una enzima es la capacidad de la enzima de resistir la inactivación térmica irreversible. Para la amilasa maltogénica, se determina encontrando la cantidad de actividad de la enzima restante tras la incubación de la enzima en un tampón (pH6) durante 10 minutos ambos a 25°C y a 72°C.

5 [0069] La alfa-amilasa maltogénica se puede incluir en el rango de 1-30, preferiblemente 2-25, de forma más preferible 5-20, o de la forma más preferible 8-13 MANU/g de sustancia seca del aditivo.

[0070] Una Unidad Novo de Amilasa Maltogénica (MANU) es la cantidad de enzima que bajo el estándar disociará un pmol de maltotriosa por minuto. Las condiciones estándar son 10 mg/ml maltotriosa, 37°C, pH 5,0, 30 minutos tiempo de reacción.

10 Alfa-amilasa (EC 3.2.1.1)

[0071] Una enzima de alfa-amilasa también puede ser exógena, microbiana y añadida a los procesos y/o composiciones de la invención. La alfa-amilasa puede ser una alfa-amilasa de Bacillus. Las alfa-amilasas de Bacillus bien conocidas incluyen alfa-amilasa derivada de una cepa de B. licheniformis, B. amyloliquefaciens y B. stearothermophilus.

[0072] En un aspecto, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa de la SEC ID nº 2.

[0073] En un aspecto de la invención la alfa-amilasa tiene al menos un 70% identidad, tal como al menos un 75%, tal como al menos un 80%, tal como al menos un 85%, tal como al menos un 86%, tal como al menos un 87%, tal como al menos un 88%, tal como al menos un 89%, tal como al menos un 90%, tal como al menos un 91%, tal como al menos un 92%, tal como al menos un 93%, tal como al menos un 94%, tal como al menos un 95%, tal como al menos un 96%, tal como al menos un 97%, tal como al menos un 98%, tal como al menos un 99% o incluso un 100% de identidad a la secuencia mostrada en SEC ID nº 2.

[0074] La alfa-amilasa se puede añadir en el rango de 0,001 a 10 KNU, preferiblemente de 0,01 a 5 KNU, incluso de forma más preferible entre 0,1 y 2 KNU por gramo de sustancia seca del aditivo.

[0075] Una Kilo Unidad Novo de alfa-amilasa (KNU) equivale a 1000 NU. Un KNU se define como la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándar (es decir a 37°C +/- 0,05; 0,0003 M Ca<sup>2+</sup>; y pH 5,6) dextriniza 5,26 g de sustancia seca de almidón Merck Amylum soluble.

35 Pululanasa (E.C. 3.2.1.41)

[0076] Las pululanosas usadas en los procesos según la presente invención son preferiblemente pululanosas de las especies por ejemplo Pyrococcus o Bacillus, tales como Bacillus acidopullulyticus (por ejemplo, aquella descrita en FEMS Microbiol. Letters 115: 97-106) o Bacillus deramificans, o Bacillus nagano-encis. La pululanasa también puede ser una pululanasa manipulada a partir de, por ejemplo, una cepa de Bacillus.

[0077] Otras pululanosas que son usadas preferiblemente en los procesos según la invención incluyen: Bacillus deramificans (patente estadounidense nº 5,736,375), o la pululanasa se puede derivar de Pyrococcus Woesei descrita en el documento PCT/DK91/00219 (WO 92/02614), o la pululanasa se puede derivar de Fervidobacterium sp. Ven 5 descrita en el documento PCT/DK92/00079 (WO 92/16617), o la pululanasa se puede derivar de Thermococcus celer descrita en el documento PCT/DK95/00097 (WO 95/23852), o la pululanasa se puede derivar de Pyrodictium abysssei descrita en el documento PCT/DK95/00211 (WO 95/34644), o la pululanasa se puede derivar de Fervidobacterium pennavorans descrita en el documento PCT/DK95/00095 (WO 95/23850), o la pululanasa se puede derivar de Desulfurococcus mucosus descrita en el documento PCT/DK95/00098 (WO 95/23853).

[0078] De la forma más preferible la pululanasa se deriva de Bacillus acidopullulyticus.

[0079] Una enzima de pululanasa preferida para su uso en los procesos y/o composiciones de la invención es una pululanasa con una secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 3.

[0080] En un aspecto de la invención la pululanasa tiene al menos un 70%, tal como al menos un 75%, tal como al menos un 80%, tal como al menos un 85%, tal como al menos un 86%, tal como al menos un 87%, tal como al menos un 88%, tal como al menos un 89%, tal como al menos un 90%, tal como al menos un 91%, tal como al menos un 92%, tal como al menos un 93%, tal como al menos un 94%, tal como al menos un 95%, tal como al menos un 96%, tal como al menos un 97%, tal como al menos un 98%, tal como al menos un 99% o incluso un 100% de identidad a la secuencia mostrada en la SEC ID nº 3.

[0081] En un aspecto de la invención, la pululanasa es termoestable. Un ejemplo de tal pululanasa es una pululanasa descrita en el documento WO2009075682.

[0082] Para la pululanasa, la termoestabilidad se determina encontrando la cantidad de actividad de la enzima restante después de la incubación de la enzima en un tampón (pH 5) durante 10 minutos ambos a 25°C y a 64°C.

5 [0083] La pululanasa se adiciona en dosis de 0,1 a 3 PUN/g de aditivo de sustancia seca (DM), tal como de 0,2 a 2,9, tal como de 0,3 a 2,8, tal como de 0,3 a 2,7, tal como de 0,3 a 2,6, tal como de 0,3 a 2,5, tal como de 0,3 a 2,4, tal como de 0,3 a 2,3, tal como de 0,3 a 2,2, tal como de 0,3 a 2,1, tal como de 0,3 a 2,0, tal como de 0,3 a 1,9, tal como de 0,3 a 1,8, tal como de 0,3 a 1,7, tal como de 0,3 a 1,6, de la forma más preferible se añade pululanasa en dosis tal como de 0,3 a 1,5, preferiblemente de 0,4 a 1,4, de forma más preferible de 0,5 a 1,3, de forma más preferible de 0,6 a 1,2, de forma más preferible de 0,7 a 1,1, de forma más preferible de 0,8 a 1,0, de forma más preferible de 0,9 a 1,0. En unas formas de realización particulares la enzima se añade en 0,3 PUN/g de aditivo de DM, tal como en 0,4 PUN/g de aditivo de DM, tal como en 0,5 PUN/g de aditivo de DM, tal como en 0,6 PUN/g de aditivo de DM, tal como en 0,7 PUN/g de aditivo de DM. En una forma de realización particularmente preferida la dosis de enzimas no es mayor que 1 PUN/g de aditivo de DM.

15 [0084] Una unidad de pululanasa (PUN) es la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándar (es decir después de 30 minutos de tiempo de reacción a 40°C y pH 5,0; y con 0,2% pululano como sustrato) hidroliza pululano, liberando carbohidrato reductor con una poder reductor equivalente a 1 micromol de glucosa por minuto.

20 [0085] La actividad de pululanasa se mide mediante detección de la capacidad de azúcar reductora aumentada (reacción So-mogyi-Nelson) en las siguientes condiciones: Sustrato: 0,2% pululano, pH 5,0, tiempo de reacción 30 minutos. Las muestras se analizan por espectrofotómetro a OD 520 nm.

#### Beta-amilasa (E.C 3.2.1.2)

25 [0086] Beta-amilasa es el nombre dado generalmente a las amilasas maltogénicas exo, que catalizan la hidrólisis de enlaces 1,4-alfa-glucosídicos en la amilosa, la amilopectina y los polímeros de glucosa relacionados.

30 [0087] Se han aislado beta-amilasas de varias plantas y microorganismos (W. M. Fogarty y C. T. Kelly, 1979, Progress in Industrial Microbiology, 15: 112-115). Estas beta-amilasas se caracterizan por el hecho de tener temperaturas óptimas en el rango de 40 grados C a 65 grados C y un pH óptimo en el rango de 4,5 a 7,0. Las beta-amilasas contempladas incluyen la beta-amilasa de cebada Spezyme.RTM. BBA 1500, Spezyme.RTM. DBA y Optimalt.TM. ME, Optimalt.TM. BBA de Genencor Int. al igual que Novozym.TM. WBA de Novozymes A/S.

35 [0088] Las beta-amilasas se incluyen generalmente en el rango de 1 a 25 BAMU/g de aditivo de DM, tal como de 1 a 20 BAMU/g de aditivo de DM, tal como de 1 a 15 BAMU/g de aditivo de DM, tal como de 1 a 10

[0089] BAMU/g de aditivo de DM, tal como de 2 a 7 BAMU/g de aditivo de DM, tal como de 2 a 6 BAMU/g de aditivo de DM, tal como de 4 a 6 BAMU/g de aditivo de DM.

40 [0090] Una unidad de beta-amilasa (BAMU) se define como la cantidad de enzima que degrada un  $\mu\text{mol}$  de maltohexaosa por minuto bajo las siguientes condiciones (37°C, pH 5,5, 200 seg incubación, 0,856 mM sustrato de maltotexaosa, actividad suficiente de una enzima oxidativa de maltosa que libere  $\text{H}_2\text{O}_2$  por ejemplo 4,8 LOXU/mL lactosa oxidasa, 1,7 mM 4-aminoantipirina (AA), 4,3 mM N-etil-N sulfopropil-m-toluidina (TOPS), 2,1 U/mL peroxidasa (Sigma).

45 [0091] La beta-amilasa actúa en el final no-reducido de maltohexaosa (G6) para formar maltosa (G2) y maltotetraosa (G4), la hidrólisis se mide con un método que cuantifica el final reductor, tal como el uso de carbohidratos o lactosa oxidasa y  $\text{O}_2$  para formar  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado activa en presencia de peroxidasa la condensación oxidativa de 4-aminoantipirina (AA) y N-etil-N sulfopropil-m-toluidina (TOPS), para formar un producto morado que se puede cuantificar por su absorbancia a 540 nm. La reacción es iniciada por maltohexaosa (G6). Cuando todos los componentes excepto la beta-amilasa se encuentran en exceso, el índice del aumento de absorbancia es proporcional a la actividad de la beta-amilasa presente.

50 [0092] En un aspecto, la beta-amilasa es termoestable. Un ejemplo de una beta-amilasa termoestable es la beta-amilasa de *Clostridium thermosulfurogenes*. Un ejemplo de tal beta-amilasa se encuentra en Kitamoto et al., 1988, J. Bacteriol, 170 (12) 5848-5854.

[0093] En un aspecto, la beta-amilasa es una beta-amilasa con una secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 4.

60 [0094] En un aspecto de la invención la beta-amilasa tiene al menos un 70% de identidad, tal como al menos un 75%, tal como al menos un 80%, tal como al menos un 85%, tal como al menos un 86%, tal como al menos un 87%, tal como al menos un 88%, tal como al menos un 89%, tal como al menos un 90%, tal como al menos un 91%, tal como al menos un 92%, tal como al menos un 93%, tal como al menos un 94%, tal como al menos un 95%, tal como al menos un 96%, tal como al menos un 97%, tal como al menos un 98%, tal como al menos un 99% o incluso un 100% de identidad a la secuencia mostrada en la SEC ID nº 4.

65



Ejemplos

Ejemplo 1:

5 [0095] El objetivo de este ejemplo es demostrar el beneficio de tener las 3 enzimas (pululanasa, alfa-amilasa maltogénica y una alfa-amilasa) presentes durante la maceración en comparación con tener sólo 2 de ellas en diferentes combinaciones y dosis.

10 [0096] Una molienda que comprende 50% sémola de maíz no pregelatinizada y 50% malta bien manipulada (WM) fue molida (0,2 mm gap en un triturador de disco) y macerada en presencia de una pululanasa de la SEC ID nº 3, una alfa-amilasa de la SEC ID nº 2 y una alfa-amilasa maltogénica de la SEC ID nº 1. El maíz y la malta se maceraron en una proporción de 1:5 (gravedad normal) y el perfil de temperatura de maceración consistía en maceración a 52°C durante 30 min, aumento a 62°C (1°C/min), mantenimiento a 62°C durante 30 min, aumento a 72°C (1°C/min), mantenimiento a 72°C durante 30 min, aumento a 78°C (1°C/min) seguido de enfriamiento inmediato a 20°C (tiempo de maceración total de 131 minutos). El mosto y el mosto fermentado (un día de fermentación en lab. a temperatura ambiente) fueron analizados mediante HPLC (perfil de azúcar) y Anton Paar (% grado real de fermentación, RDF y extracto, Ea).

15 Las siguientes actividades enzimáticas se dosificaron en todas combinaciones diferentes: 0 o 0,7 PUN pululanasa, 0 o 0,5 KNU alfa-amilasa y 0 o 11,0 MANU alfa-amilasa maltogénica por g de aditivo de sustancia seca (DM).

20 [0097] Todos resultados se resumen en la tabla 1.

Tabla 1:

| Unidades/g de aditivo de DM    | % DP4+ (Δ%)   | % RDF (Δ%)    |
|--------------------------------|---------------|---------------|
| Sin dosis de enzimas (control) | 31,7          | 57,0          |
| 0,5 KNU                        | 28,6 (Δ 3,1)  | 59,9 (Δ 2,9)  |
| 0,5 KNU + 11 MANU              | 22,2 (Δ 9,5)  | 65,9 (Δ 8,9)  |
| 0,5 KNU + 0,7 PUN              | 26,7 (Δ 5,0)  | 61,4 (Δ 4,4)  |
| 11 MANU + 0,7 PUN              | 21,2 (Δ 10,5) | 67,6 (Δ 10,6) |
| 0,5 KNU + 0,7 PUN + 11 MANU    | 20,0 (Δ 11,7) | 68,6 (Δ 11,6) |

25 [0098] Los datos anteriores muestran que la combinación de una alfa-amilasa, una pululanasa y una alfa-amilasa maltogénica produce mejores características de mosto que el uso de las enzimas solas en una combinación única o en combinaciones dobles.

30 Ejemplo 2

[0099] El objetivo era valorar la temperatura óptima de la beta-amilasa de Clostridium thermosulfurogenes.

35 [0100] La temperatura óptima de beta-amilasa de la SEC ID nº 4 obtenible de Clostridium thermosulfurogenes se determinó mediante la liberación de maltosa a partir de amilopectina que mide los extremos de reducción por reactivo PHABH. Se pre-incubó 1 mL sustrato (1% p/v amilopectina de patata en 50 mM NaOAc, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 4,5) a 60°C durante 10 minutos. Como control se retiraron 150 µL antes de la adición enzimática y se mezclaron con 75 µL reactivo de parada (0,75 g PHABH (Sigma), 2,5 g K-Na tartrato (Merck) y 50 ml a 2% NaOH). Para incubaciones enzimáticas, se añadieron 150 µL solución enzimática al sustrato y se incubaron durante 10 min a 30, 40, 50, 60, 70, o 80°C. Se añadieron 75 µL reactivo de parada y la solución se incubó a 100°C durante 15 min. Se transfirieron 200 µL a tubos de PCR y se midió la absorbancia a 410 nm. El experimento se llevó a cabo por triplicado. El pH óptimo de la beta-amilasa de Clostridium thermosulfurogenes fue determinado según el procedimiento anterior con las siguientes modificaciones. La incubación se llevó a cabo a 60°C a pH 4, 5, 6, 7, 8 o 9.

45 Tabla 2: temperatura óptima

| °C | Abs410 |
|----|--------|
| 30 | 0,255  |
| 40 | 0,325  |
| 50 | 0,329  |
| 60 | 0,414  |
| 70 | 0,470  |
| 80 | 0,471  |

Tabla 3: pH óptimo

| pH | Abs410 |
|----|--------|
| 4  | 0,402  |
| 5  | 0,524  |
| 6  | 0,631  |
| 7  | 0,595  |
| 8  | 0,354  |
| 9  | 0,140  |

5 [0101] La beta-amilasa de *Clostridium thermosulfurogenes* tiene su temperatura óptima a 70-80°C y su pH óptimo alrededor de pH 5-7 (tabla 2 y 3).  
En comparación, la beta-amilasa de cebada tiene la temperatura óptima a 60-65°C en condiciones de trituración (pH 5,8) (Kunze (1999), Technology Brewing and Malting, Editorial VLB, Berlín).

## Ejemplo 3

10 [0102] El objetivo de este ejemplo era demostrar el beneficio de tener una beta-amilasa termoestable presente durante la maceración y filtración en combinación con una pululanasa y alfa-amilasa.

15 [0103] Una molienda que comprende 50% sémola de maíz no pregelatinizada y 50% malta bien modificada (WM) fue molida (0,2 mm gap en un triturador de disco) y macerada en presencia de una pululanasa de la SEC ID nº 3, una alfa-amilasa de la SEC ID nº 2 y beta-amilasa de la SEC ID nº 4. El maíz y malta se maceraron en una proporción de 1:5 (gravedad normal) y el perfil de temperatura de maceración consistía en maceración a 52°C durante 30 min, aumento a 62°C (1°C/min), mantenimiento a 62°C durante 30 min, aumento a 72°C (1°C/min), mantenimiento a 72°C durante 30 min, aumento a 78°C (1°C/min) seguido de incubación durante 2 horas a 78°C (filtración simulada) seguido de enfriamiento inmediato a 20°C. El mosto y mosto fermentado (un día de fermentación de laboratorio a temperatura ambiente) fueron analizados mediante HPLC (perfil de azúcar) y Anton Paar (% grado real de fermentación, RDF y extracto, Ea). Las siguientes actividades enzimáticas fueron dosificadas en todas las combinaciones diferentes: 0 o 0,7 PUN pululanasa, 0, 0,15 KNU alfa-amilasa y 0 o 2,5 BAMU beta-amilasa por g aditivo de sustancia seca. Los resultados se dan en la tabla 4 a continuación:

25 Tabla 4: perfil de azúcar de mosto (% azúcares totales) y % RDF (grado real de fermentación) en el mosto fermentado. Pululanasa (PUN), alfa-amilasa (KNU), beta-amilasa (BAMU).

| Dosis enzimática (unidades/g de aditivo de DM) |      |      | % DP4+ | % RDF |
|--|------|------|--------|-------|
| PUN  | KNU  | BAMU |        |       |
| -  | -    | -    | 26,6   | 57,4  |
| 0,7  | -    | -    | 23,3   | 60,0  |
| 0,7  | 0,15 | -    | 20,8   | 62,6  |
| 0,7  | 0,15 | 2,5  | 14,2   | 69,8  |

30 [0104] La tabla 4 demuestra el beneficio de tener una beta-amilasa termoestable presente durante la maceración en combinación con una pululanasa y alfa-amilasa. Un nivel marcadamente más alto de maltosa se obtuvo dando como resultado un nivel inferior de azúcares no fermentables (DP4+) y en consecuencia un %RDF más alto del mosto fermentado.

## Ejemplo 4

35 [0105] Una molienda que comprende 50% sémola de maíz no pregelatinizada y 50% malta bien modificada (WM) fue molida (0,2 mm gap en un triturador de disco) y macerada en presencia de una alfa-amilasa maltogénica de la SEC ID nº 1, una alfa-amilasa de la SEC ID nº 2 y una pululanasa de la SEC ID nº 3. El maíz y malta fueron macerados en una proporción de 1:3 (gravedad alta) y el perfil de temperatura de maceración consistió en maceración a 52°C durante 30 min, aumento a 62°C (1°C/min), mantenimiento a 62°C durante 30 min, aumento a 72°C (1°C/min), mantenimiento a 72°C durante 30 min, aumento a 78°C (1°C/min) y luego inmediatamente enfriamiento a 20°C (3,9°C/min) dando como resultado un tiempo de maceración de total de 131 minutos. El mosto y mosto fermentado (un día de fermentación en lab a temperatura ambiente) se analizaron mediante HPLC (perfil de azúcar) y Anton Paar (% grado real de fermentación, RDF y extracto, Ea). Las siguientes actividades enzimáticas fueron dosificadas: 0,7 PUN pululanasa, 0,5 KNU alfa-amilasa y 11,0 MANU alfa-amilasa maltogénica por gramo de aditivo de sustancia seca.

50 [0106] Los resultados están resumidos en la tabla 5, demostrando que la combinación de una amilasa maltogénica, una alfa-amilasa y una pululanasa produce una mejora en la hidrólisis del almidón, la formación de maltosa y el % RDF.

Tabla. 5. dosis enzimática, perfil de azúcar de mosto (% azúcar total), nivel de extracto de mosto (g/100 mL) y % RDF obtenido para las 4 variantes enzimáticas en comparación con el tipo silvestre.

| Alfa-amilasa maltogénica | % DP1 | % DP2 | % DP3 | % DP4 | Extracto (g/100 mL) | % RDF |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|---------------------|-------|
| SEC ID nº 1              | 16,7  | 42,1  | 14,8  | 25,1  | 20,6                | 65,4  |
| Variante 1               | 18,7  | 43,6  | 13,4  | 23,3  | 20,6                | 70,3  |
| Variante 2               | 20,6  | 45,3  | 13,5  | 19,4  | 20,6                | 69,8  |
| Variante 3               | 18,4  | 43,5  | 14,0  | 22,9  | 20,7                | 67,1  |
| Variante 4               | 18,3  | 43,3  | 14,3  | 22,9  | 20,6                | 67,4  |

5 [0107] Las variantes se definen en el ejemplo 5, tabla 6 a continuación.

[0108] El término "DP1" (grado de polimerización 1) denota glucosa, "DP2" denota maltosa y DP3 denota maltotriosa. Los términos "DP4+" o "DP4/4+" indica dextrina, o maltooligosacáridos de un grado de polimerización 4 o superior.

10 [0109] El término "RDF" significa grado real de fermentación. RDF (grado real de fermentación) se calcula como  $\%RDF = 100 \cdot (OE\%P - ER\%) / OE\%P$  mientras que OE significa extracto original en %P y ER significa extracto real en %P medido por un densitómetro (referencia Analytica EBC). RDF: grado real de fermentación, se determinó mediante el método descrito en el método MEBAK: 2.9.2. Principal: reducción de sustancia seca de mosto, en %, por fermentación en alcohol y CO<sub>2</sub>.

[0110] La tabla anterior demuestra que las variantes dan un RDF más alto que la enzima de la SEC ID nº 1. Entre las variantes, la variante 2 parece ser la mejor.

20 Ejemplo 5

[0111] Se estudió la tolerancia a la sacarosa de 4 variantes de alfa-amilasa maltogénica.

25 [0112] La tolerancia a la sacarosa fue determinada incubando la enzima dada en un tampón (pH 5,0) que contiene 10% sacarosa (%p/v) durante 15 minutos a 60°C. Inmediatamente tras la incubación la actividad residual de la enzima se determinó mediante el ensayo Phadebas (actividad endo de alfa-amilasa). El 100% de tolerancia a la sacarosa corresponde a la actividad residual obtenida de la alfa-amilasa maltogénica cuando no hay ninguna sacarosa presente en el tampón de incubación.

30 [0113] Los resultados están resumidos en la tabla 6 que demuestra que las 4 variantes de alfa-amilasa maltogénica son más tolerantes a la sacarosa que el tipo silvestre.

Tabla 6: modificaciones de aminoácido y tolerancia a la sacarosa de variantes de enzima alfa-amilasa maltogénica en comparación con el tipo silvestre.

| Alfa-amilasa maltogénica | Modificaciones de aminoácido     | % tolerancia a la sacarosa |
|--------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| SEC ID nº 1              | -                                | 12                         |
| Variante 1               | Y89F, W93F, P191S, D261G, T288P  | 70                         |
| Variante 2               | Y89F, P191S, F194Y, D261G, T288P | 53                         |
| Variante 3               | Y89F, P191S, D261G, T288P, Y360F | 40                         |
| Variante 4               | Y89F, P191S, D261G, T288P, Y360N | 40                         |

[0114] De la tabla, parece que la variante 1 es un 58%, la variante 2 es un 41% y las variantes 3 y 4 son un 28% más tolerantes a la sacarosa respectivamente que la SEC ID nº 1.

40 Listado de secuencias

[0115]

<110> Novozymes A/S

45 <120> Método de elaboración

<130> 11677-WO-PCT

50 <160> 4

<170> PatentIn version 3.5

ES 2 539 726 T3

<210> 1

<211> 685

<212> PRT

5 <213> Bacillus stearothermophilus

<400> 1

Ala Ser Ser Ser Ala Ser Val Lys Gly Asp Val Ile Tyr Gln Ile Ile  
1 5 10 15

Ile Asp Arg Phe Tyr Asp Gly Asp Thr Thr Asn Asn Asn Pro Ala Lys  
20 25 30

Ser Tyr Gly Leu Tyr Asp Pro Thr Lys Ser Lys Trp Lys Met Tyr Trp  
35 40 45

Gly Gly Asp Leu Glu Gly Val Arg Gln Lys Leu Pro Tyr Leu Lys Gln  
50 55 60

Leu Gly Val Thr Thr Ile Trp Leu Ser Pro Val Leu Asn Asn Leu Asp  
65 70 75 80

Thr Leu Ala Gly Thr Asp Asn Thr Gly Tyr His Gly Tyr Trp Thr Arg  
85 90 95

Asp Phe Lys Gln Ile Glu Glu His Phe Gly Asn Trp Thr Thr Phe Asp  
100 105 110

Thr Leu Val Asn Asp Ala His Gln Asn Gly Ile Lys Val Ile Val Asp  
115 120 125

Phe Val Pro Asn His Ser Thr Pro Phe Lys Ala Asn Asp Ser Thr Phe  
130 135 140

Ala Glu Gly Gly Ala Leu Tyr Asn Asn Gly Thr Tyr Met Gly Asn Tyr  
145 150 155 160

Phe Asp Asp Ala Thr Lys Gly Tyr Phe His His Asn Gly Asp Ile Ser  
165 170 175

Asn Trp Asp Asp Arg Tyr Glu Ala Gln Trp Lys Asn Phe Thr Asp Pro  
180 185 190

ES 2 539 726 T3

Ala Gly Phe Ser Leu Ala Asp Leu Ser Gln Glu Asn Gly Thr Ile Ala  
195 200 205

Gln Tyr Leu Thr Asp Ala Ala Val Gln Leu Val Ala His Gly Leu Arg  
210 215 220

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

Asp Lys Leu Tyr Gln Lys Lys Asp Ile Phe Leu Val Gly Glu Trp Tyr  
245 250 255

Gly Asp Asp Pro Gly Thr Ala Asn His Leu Glu Lys Val Arg Tyr Ala  
260 265 270

Asn Asn Ser Gly Val Asn Val Leu Asp Phe Asp Leu Asn Thr Val Ile  
275 280 285

Arg Asn Val Phe Gly Thr Phe Thr Gln Thr Met Tyr Asp Leu Asn Asn  
290 295 300

Met Val Asn Gln Thr Gly Asn Glu Tyr Lys Tyr Lys Glu Asn Leu Ile  
305 310 315 320

Thr Phe Ile Asp Asn His Asp Met Ser Arg Phe Leu Ser Val Asn Ser  
325 330 335

Lys Asn Lys Ala Asn Leu His Gln Arg Leu Leu Ser Phe Ser Leu Arg  
340 345 350

Gly Val Arg Pro Pro Ile Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln Tyr Met Ala Gly  
355 360 365

Gly Asn Asp Pro Tyr Asn Arg Gly Met Met Pro Ala Phe Asp Thr Thr  
370 375 380

Thr Thr Ala Phe Lys Glu Val Ser Thr Leu Ala Gly Leu Arg Arg Asn  
385 390 395 400

Asn Ala Ala Ile Gln Tyr Gly Thr Thr Thr Gln Arg Trp Ile Asn Asn  
405 410 415

Asp Val Tyr Ile Tyr Glu Arg Lys Phe Phe Asn Asp Val Val Leu Val  
420 425 430

Ala Ile Asn Arg Asn Thr Gln Ser Ser Tyr Ser Ile Ser Gly Leu Gln  
435 440 445

---

ES 2 539 726 T3

Thr Ala Leu Pro Asn Gly Ser Tyr Ala Asp Tyr Leu Ser Gly Leu Leu  
 450 455 460

Gly Gly Asn Gly Ile Ser Val Ser Asn Gly Ser Val Ala Ser Phe Thr  
 465 470 475 480

Leu Ala Pro Gly Ala Val Ser Val Trp Gln Tyr Ser Thr Ser Ala Ser  
 485 490 495

Ala Pro Gln Ile Gly Ser Val Ala Pro Asn Met Gly Ile Pro Gly Asn  
 500 505 510

Val Val Thr Ile Asp Gly Lys Gly Phe Gly Thr Thr Gln Gly Thr Val  
 515 520 525

Thr Phe Gly Gly Val Thr Ala Thr Val Lys Ser Trp Thr Ser Asn Arg  
 530 535 540

Ile Glu Val Tyr Val Pro Asn Met Ala Ala Gly Leu Thr Asp Val Lys  
 545 550 555 560

Val Thr Ala Gly Gly Val Ser Ser Asn Leu Tyr Ser Tyr Asn Ile Leu  
 565 570 575

Ser Gly Thr Gln Thr Ser Val Val Phe Thr Val Lys Ser Ala Pro Pro  
 580 585 590

Thr Asn Leu Gly Asp Lys Ile Tyr Leu Thr Gly Asn Ile Pro Glu Leu  
 595 600 605

Gly Asn Trp Ser Thr Asp Thr Ser Gly Ala Val Asn Asn Ala Gln Gly  
 610 615 620

Pro Leu Leu Ala Pro Asn Tyr Pro Asp Trp Phe Tyr Val Phe Ser Val  
 625 630 635 640

Pro Ala Gly Lys Thr Ile Gln Phe Lys Phe Phe Ile Lys Arg Ala Asp  
 645 650 655

Gly Thr Ile Gln Trp Glu Asn Gly Ser Asn His Val Ala Thr Thr Pro  
 660 665 670

Thr Gly Ala Thr Gly Asn Ile Thr Val Thr Trp Gln Asn  
 675 680 685

<210> 2  
 <211> 491  
 <212> PRT

5

ES 2 539 726 T3

<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

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

ES 2 539 726 T3

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 Asn 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  
 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 Val 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  
 485 490

<210> 3  
 <211> 829  
 <212> PRT  
 <213> Bacillus acidopullulyticus

5



ES 2 539 726 T3

<400> 3

Asp Ser Thr Ser Thr Glu Val Ile Val His Tyr His Arg Phe Asp Ser  
 1 5 10 15  
 Asn Tyr Ala Asn Trp Asp Leu Trp Met Trp Pro Tyr Gln Pro Val Asn  
 20 25 30  
 Gly Asn Gly Ala Ala Tyr Glu Phe Ser Gly Lys Asp Asp Phe Gly Val  
 35 40 45  
 Lys Ala Asp Val Gln Val Pro Gly Asp Asp Thr Gln Val Gly Leu Ile  
 50 55 60  
 Val Arg Thr Asn Asp Trp Ser Gln Lys Asn Thr Ser Asp Asp Leu His  
 65 70 75 80  
 Ile Asp Leu Thr Lys Gly His Glu Ile Trp Ile Val Gln Gly Asp Pro  
 85 90 95  
 Asn Ile Tyr Tyr Asn Leu Ser Asp Ala Gln Ala Ala Ala Thr Pro Lys  
 100 105 110  
 Val Ser Asn Ala Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Thr Val Leu Ala Lys Leu  
 115 120 125  
 Thr Asn Pro Met Thr Leu Ser Asp Gly Ser Ser Gly Phe Thr Val Thr  
 130 135 140  
 Asp Lys Thr Thr Gly Glu Gln Ile Pro Val Thr Ala Ala Thr Asn Ala  
 145 150 155 160  
 Asn Ser Ala Ser Ser Ser Glu Gln Thr Asp Leu Val Gln Leu Thr Leu  
 165 170 175  
 Ala Ser Ala Pro Asp Val Ser His Thr Ile Gln Val Gly Ala Ala Gly  
 180 185 190  
 Tyr Glu Ala Val Asn Leu Ile Pro Arg Asn Val Leu Asn Leu Pro Arg  
 195 200 205  
 Tyr Tyr Tyr Ser Gly Asn Asp Leu Gly Asn Val Tyr Ser Asn Lys Ala  
 210 215 220  
 Thr Ala Phe Arg Val Trp Ala Pro Thr Ala Ser Asp Val Gln Leu Leu  
 225 230 235 240  
 Leu Tyr Asn Ser Glu Thr Gly Pro Val Thr Lys Gln Leu Glu Met Gln

ES 2 539 726 T3

245 250 255

Lys Ser Asp Asn Gly Thr Trp Lys Leu Lys Val Pro Gly Asn Leu Lys  
 260 265 270

Asn Trp Tyr Tyr Leu Tyr Gln Val Thr Val Asn Gly Lys Thr Gln Thr  
 275 280 285

Ala Val Asp Pro Tyr Val Arg Ala Ile Ser Val Asn Ala Thr Arg Gly  
 290 295 300

Met Ile Val Asp Leu Glu Asp Thr Asn Pro Pro Gly Trp Lys Glu Asp  
 305 310 315 320

His Gln Gln Thr Pro Ala Asn Pro Val Asp Glu Val Ile Tyr Glu Val  
 325 330 335

His Val Arg Asp Phe Ser Ile Asp Ala Asn Ser Gly Met Lys Asn Lys  
 340 345 350

Gly Lys Tyr Leu Ala Phe Thr Glu His Gly Thr Lys Gly Pro Asp Asn  
 355 360 365

Val Lys Thr Gly Ile Asp Ser Leu Lys Glu Leu Gly Ile Asn Ala Val  
 370 375 380

Gln Leu Gln Pro Ile Glu Glu Phe Asn Ser Ile Asp Glu Thr Gln Pro  
 385 390 395 400

Asn Met Tyr Asn Trp Gly Tyr Asp Pro Arg Asn Tyr Asn Val Pro Glu  
 405 410 415

Gly Ala Tyr Ala Thr Thr Pro Glu Gly Thr Ala Arg Ile Thr Gln Leu  
 420 425 430

Lys Gln Leu Ile Gln Ser Ile His Lys Asp Arg Ile Ala Ile Asn Met  
 435 440 445

Asp Val Val Tyr Asn His Thr Phe Asn Val Gly Val Ser Asp Phe Asp  
 450 455 460

Lys Ile Val Pro Gln Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asp Ser Ala Gly Asn Tyr  
 465 470 475 480

Thr Asn Gly Ser Gly Val Gly Asn Glu Ile Ala Thr Glu Arg Pro Met  
 485 490 495

Val Gln Lys Phe Val Leu Asp Ser Val Lys Tyr Trp Val Lys Glu Tyr  
 500 505 510

ES 2 539 726 T3

His Ile Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Met Ala Leu Leu Gly Lys Asp  
 515 520 525  
 Thr Met Ala Lys Ile Ser Lys Glu Leu His Ala Ile Asn Pro Gly Ile  
 530 535 540  
 Val Leu Tyr Gly Glu Pro Trp Thr Gly Gly Thr Ser Gly Leu Ser Ser  
 545 550 555 560  
 Asp Gln Leu Val Thr Lys Gly Gln Gln Lys Gly Leu Gly Ile Gly Val  
 565 570 575  
 Phe Asn Asp Asn Ile Arg Asn Gly Leu Asp Gly Asn Val Phe Asp Lys  
 580 585 590  
 Ser Ala Gln Gly Phe Ala Thr Gly Asp Pro Asn Gln Val Asn Val Ile  
 595 600 605  
 Lys Asn Gly Val Met Gly Ser Ile Ser Asp Phe Thr Ser Ala Pro Ser  
 610 615 620  
 Glu Thr Ile Asn Tyr Val Thr Ser His Asp Asn Met Thr Leu Trp Asp  
 625 630 635 640  
 Lys Ile Ser Ala Ser Asn Pro Asn Asp Thr Gln Ala Asp Arg Ile Lys  
 645 650 655  
 Met Asp Glu Leu Ala Gln Ala Val Val Phe Thr Ser Gln Gly Val Pro  
 660 665 670  
 Phe Met Gln Gly Gly Glu Glu Met Leu Arg Thr Lys Gly Gly Asn Asp  
 675 680 685  
 Asn Ser Tyr Asn Ala Gly Asp Ser Val Asn Gln Phe Asp Trp Ser Arg  
 690 695 700  
 Lys Ala Gln Phe Glu Asn Val Phe Asp Tyr Tyr Ser Trp Leu Ile His  
 705 710 715 720  
 Leu Arg Asp Asn His Pro Ala Phe Arg Met Thr Thr Ala Asp Gln Ile  
 725 730 735  
 Lys Gln Asn Leu Thr Phe Leu Asp Ser Pro Thr Asn Thr Val Ala Phe  
 740 745 750  
 Glu Leu Lys Asn His Ala Asn His Asp Lys Trp Lys Asn Ile Ile Val  
 755 760 765

---

ES 2 539 726 T3

Met Tyr Asn Pro Asn Lys Thr Ala Gln Thr Leu Thr Leu Pro Ser Gly  
 770 775 780

Asn Trp Thr Ile Val Gly Leu Gly Asn Gln Val Gly Glu Lys Ser Leu  
 785 790 795 800

Gly His Val Asn Gly Thr Val Glu Val Pro Ala Leu Ser Thr Ile Ile  
 805 810 815

Leu His Gln Gly Thr Ser Glu Asp Val Ile Asp Gln Asn  
 820 825

<210> 4

<211> 551

<212> PRT

5 <213> Clostridium thermasulfurogenes

<400> 4

Met Ile Gly Ala Phe Lys Arg Leu Gly Gln Lys Leu Phe Leu Thr Leu  
 1 5 10 15

Leu Thr Ala Ser Leu Ile Phe Ala Ser Ser Ile Val Thr Ala Asn Ala  
 20 25 30

Ser Ile Ala Pro Asn Phe Lys Val Phe Val Met Gly Pro Leu Glu Lys  
 35 40 45

Val Thr Asp Phe Asn Ala Phe Lys Asp Gln Leu Ile Thr Leu Lys Asn  
 50 55 60

Asn Gly Val Tyr Gly Ile Thr Thr Asp Ile Trp Trp Gly Tyr Val Glu  
 65 70 75 80

Asn Ala Gly Glu Asn Gln Phe Asp Trp Ser Tyr Tyr Lys Thr Tyr Ala  
 85 90 95

Asp Thr Val Arg Ala Ala Gly Leu Lys Trp Val Pro Ile Met Ser Thr  
 100 105 110

His Ala Cys Gly Gly Asn Val Gly Asp Thr Val Asn Ile Pro Ile Pro  
 115 120 125

Ser Trp Val Trp Thr Lys Asp Thr Gln Asp Asn Met Gln Tyr Lys Asp  
 130 135 140

Glu Ala Gly Asn Trp Asp Asn Glu Ala Val Ser Pro Trp Tyr Ser Gly  
 145 150 155 160

Leu Thr Gln Leu Tyr Asn Glu Phe Tyr Ser Ser Phe Ala Ser Asn Phe

ES 2 539 726 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |
| Ser | Ser | Tyr | Lys | Asp | Ile | Ile | Thr | Lys | Ile | Tyr | Ile | Ser | Gly | Gly | Pro |     |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |
| Ser | Gly | Glu | Leu | Arg | Tyr | Pro | Ser | Tyr | Asn | Pro | Ser | His | Gly | Trp | Thr |     |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |
| Tyr | Pro | Gly | Arg | Gly | Ser | Leu | Gln | Cys | Tyr | Ser | Lys | Ala | Ala | Ile | Thr |     |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |
| Ser | Phe | Gln | Asn | Ala | Met | Lys | Ser | Lys | Tyr | Gly | Thr | Ile | Ala | Ala | Val |     |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |     |
| Asn | Ser | Ala | Trp | Gly | Thr | Ser | Leu | Thr | Asp | Phe | Ser | Gln | Ile | Ser | Pro |     |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |     |
| Pro | Thr | Asp | Gly | Asp | Asn | Phe | Phe | Thr | Asn | Gly | Tyr | Lys | Thr | Thr | Tyr |     |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |     |
| Gly | Asn | Asp | Phe | Leu | Thr | Trp | Tyr | Gln | Ser | Val | Leu | Thr | Asn | Glu | Leu |     |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |     |
| Ala | Asn | Ile | Ala | Ser | Val | Ala | His | Ser | Cys | Phe | Asp | Pro | Val | Phe | Asn |     |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |
| Val | Pro | Ile | Gly | Ala | Lys | Ile | Ala | Gly | Val | His | Trp | Leu | Tyr | Asn | Ser |     |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |     |
| Pro | Thr | Met | Pro | His | Ala | Ala | Glu | Tyr | Cys | Ala | Gly | Tyr | Tyr | Asn | Tyr |     |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |     |
| Ser | Thr | Leu | Leu | Asp | Gln | Phe | Lys | Ala | Ser | Asn | Leu | Ala | Met | Thr | Phe |     |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |     |
| Thr | Cys | Leu | Glu | Met | Asp | Asp | Ser | Asn | Ala | Tyr | Val | Ser | Pro | Tyr | Tyr |     |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |     |
| Ser | Ala | Pro | Met | Thr | Leu | Val | His | Tyr | Val | Ala | Asn | Leu | Ala | Asn | Asn |     |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |     |
| Lys | Gly | Ile | Val | His | Asn | Gly | Glu | Asn | Ala | Leu | Ala | Ile | Ser | Asn | Asn |     |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |     |
| Asn | Gln | Ala | Tyr | Val | Asn | Cys | Ala | Asn | Glu | Leu | Thr | Gly | Tyr | Asn | Phe |     |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |     |
| Ser | Gly | Phe | Thr | Leu | Leu | Arg | Leu | Ser | Asn | Ile | Val | Asn | Ser | Asp | Gly |     |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |     |

ES 2 539 726 T3

Ser Val Thr Ser Glu Met Ala Pro Phe Val Ile Asn Ile Val Thr Leu  
435 440 445

Thr Pro Asn Gly Thr Ile Pro Val Thr Phe Thr Ile Asn Asn Ala Thr  
450 455 460

Thr Tyr Tyr Gly Gln Asn Val Tyr Ile Val Gly Ser Thr Ser Asp Leu  
465 470 475 480

Gly Asn Trp Asn Thr Thr Tyr Ala Arg Gly Pro Ala Ser Cys Pro Asn  
485 490 495

Tyr Pro Thr Trp Thr Ile Thr Leu Asn Leu Leu Pro Gly Glu Gln Ile  
500 505 510

Gln Phe Lys Ala Val Lys Ile Asp Ser Ser Gly Asn Val Thr Trp Glu  
515 520 525

Gly Gly Ser Asn His Thr Tyr Thr Val Pro Thr Ser Gly Thr Gly Ser  
530 535 540

Val Thr Ile Thr Trp Gln Asn  
545 550

**REIVINDICACIONES**

1. Método de maceración que comprende:
- 5 a) proporcionar una molienda que comprende malta y aditivo; y  
b) contactar la molienda con  
i) una pululanasa;  
ii) una alfa-amilasa; y  
10 iii) una alfa-amilasa maltogénica y/o una beta-amilasa para hacer un mosto.
2. Método según la reivindicación 1, donde el aditivo tiene una temperatura de gelatinización superior al almidón de malta.
3. Método según la reivindicación 1, donde el aditivo es maíz o arroz.
- 15 4. Método según la reivindicación 1, donde la alfa-amilasa maltogénica tiene al menos un 70% de identidad a la SEC ID nº 1.
5. Método según la reivindicación 1, donde la alfa-amilasa tiene al menos un 70% de identidad a la SEC ID nº 2.
- 20 6. Método según la reivindicación 1, donde la pululanasa tiene al menos un 70% de identidad a la SEC ID nº 3.
7. Método según la reivindicación 1, donde la beta-amilasa tiene al menos un 70% de identidad a la SEC ID nº 4.
- 25 8. Método según la reivindicación 1, donde la pululanasa es termoestable donde la termoestabilidad se mide encontrando la cantidad de actividad de la enzima que permanece después de la incubación de la enzima en un tampón a pH 5,0 durante 10 minutos ambos a 25°C y a 64°C.
- 30 9. Método según la reivindicación 1, donde la alfa-amilasa maltogénica es al menos un 10% más tolerante a la sacarosa que la SEC ID nº 1 donde la tolerancia a la sacarosa se mide en un tampón que contiene un 10% sacarosa (%p/v) a pH 5,0 durante 15 minutos a 60°C conforme al ejemplo 5.
10. Método según la reivindicación 1 donde la beta-amilasa tiene una temperatura óptima de 70-80°C donde la temperatura óptima se mide de acuerdo al ejemplo 2.
- 35 11. Método según la reivindicación 4, donde la alfa-amilasa maltogénica comprende las sustituciones en las posiciones Y89F, P191S, D261G y T288P en la SEC ID nº 1.
12. Método según la reivindicación 4, donde la alfa-amilasa maltogénica comprende una o más de las sustituciones W93F, Y360F, Y360N y F194Y en la SEC ID nº 1.
- 40 13. Método según la reivindicación 1, donde la molienda comprende un 30-80% de malta y un 30-80% de aditivo.
14. Método según la reivindicación 1, donde el mosto se convierte en cerveza.
- 45 15. Uso de una pululanasa, una alfa-amilasa y una alfa-amilasa maltogénica y/o una beta-amilasa termoestable en la elaboración de cerveza, donde la beta-amilasa termoestable tiene al menos un 70% de identidad a la secuencia mostrada en la SEC ID nº 4.
- 50
- 55