



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(21) **PI0708334-3 A2**

(22) Data de Depósito: 06/03/2007
(43) Data da Publicação: 24/05/2011
(RPI 2107)



* B R P I 0 7 0 8 3 3 4 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*
C12C 5/00 2006.01
C12C 7/04 2006.01

(54) Título: **MÉTODO PARA PRODUZIR UMA CERVEJA, E, USO DE COMPOSIÇÃO DE ENZIMA**

(30) Prioridade Unionista: 07/03/2006 US 60/780098

(73) Titular(es): Novozymes A/S

(72) Inventor(es): Henrik Bisgaard-Frantzen, Niels Elvig, Rikke M. Festersen

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007052076 de 06/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/101846 de 13/09/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA PRODUZIR UMA CERVEJA, E, USO DE COMPOSIÇÃO DE ENZIMA A presente invenção refere-se a um método de fermentação de cerveja compreendendo adição de uma composição de enzima compreendendo catalase sem, ou essencialmente sem, glicose oxidase de modo a melhorar o flavor e/ou a estabilidade de flavor da cerveja acabada.



PI0708334-3

1

“MÉTODO PARA PRODUZIR UMA CERVEJA, E, USO DE
COMPOSIÇÃO DE ENZIMA”

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se a um método de fermentação de
cerveja compreendendo adição de uma composição de enzima
compreendendo catalase sem, ou essencialmente sem, glicose oxidase de
modo a melhorar o flavor e/ou a estabilidade de flavor da cerveja acabada.

FUNDAMENTOS

10 É conhecida a aplicação de composições de enzima
compreendendo catalase e glicose oxidase em processos de fermentação com
o objetivo de melhorar a estabilidade de flavor da cerveja. Contudo, os
resultados obtidos com composições de catalase - glicose oxidase não têm
sido inteiramente bem sucedidos e tem sido sugerido que glicose oxidase e
sulfito poderiam ser uma alternativa atrativa (Blockmans et al. ASBC Journal
15 1987, vol. 45, 85-90). Assim há uma necessidade de outros métodos para
melhorar a estabilidade de flavor da cerveja.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

20 Os presentes inventores têm agora descoberto que o efeito do
tratamento de enzima pode ser grandemente melhorado pela aplicação de uma
composição de catalase sem glicose oxidase. Conseqüentemente, a invenção
proporciona um método de fermentação de cerveja, compreendendo adição de
uma composição de catalase (E.C. 1.11.1.6) sem, ou essencialmente sem
glicose oxidase no malte, no mosto de fermentação ou na cerveja fermentada
de modo a melhorar o flavor e/ou a estabilidade de flavor da cerveja acabada.

25 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O processo de fermentação de cerveja é bem conhecido pela
pessoa experiente na arte. Um procedimento convencional pode ser esboçado
na seguinte maneira: o material inicial é cevada maltada (i.e., umedecida,
germinada e subseqüentemente seca) e/ou adjuntos não maltados, chamados

de grãos. Durante a maltagem, onde os grãos são moídos e misturados com água, aquecidos e agitados, os carboidratos são degradados para açúcares fermentáveis pelo auxílio de enzimas naturalmente presentes no malte. Após a maltagem, é necessário separar o extrato líquido (o mosto) dos sólidos (os
5 adjuntos e as partículas de grão consumidos) com o objetivo de se obter mosto límpido. A filtração do mosto é importante porque os sólidos contêm quantidades grandes de proteína, amido insatisfatoriamente modificado, material graxo, silicatos, e polifenóis (taninos) e proteínas. Após adição de lúpulo, o mosto é fervido. Deste modo ocorrerá uma precipitação dos
10 polifenóis. Após esfriamento e remoção dos precipitados, o mosto de cerveja acabado (a) é aerado e a levedura é adicionada. Após uma fermentação principal, durando 5-10 dias, a maior parte da levedura é removida e a denominada cerveja “verde” (b) é armazenada em uma temperatura baixa, tipicamente a 0-5°C por uma a 12 semanas. Durante este período a levedura
15 restante precipitará junta com os polifenóis. Para remover os polifenóis em excesso restantes é realizada uma filtração. A cerveja fermentada (c) pode agora ser carbonatada antes do engarrafamento. Dióxido de carbono não apenas contribui para o “corpo” ou o “volume” percebido e como um intensificador de flavor, mas também atua para intensificar o potencial de
20 espumação e desempenha um papel importante na extensão da vida de prateleira do produto.

Sem estar ligado à teoria, é crido que processos de oxidação durante a maltagem e a maturação são a causa principal de sabores desagradáveis e de instabilidade de flavor na cerveja engarrafada. Os produtos
25 de oxidação mais importantes são DMS (Dimetil-sulfeto), Trans-2-nonenal (T2N). DMS e T2N são sabores desagradáveis importantes na cerveja. A causa de oxidação e a formação de oxigênio ativado são devido à lipoxigenase formada durante o processo de maltagem e oxidação não-enzimática do ferro e do Cobre (Cu^+) não reativos, um mecanismo que leva à formação de

radicais livres e peróxido de hidrogênio. Catalase de malte nativa reduz o nível de radicais de oxigênio no malte. Contudo a catalase nativa é facilmente inativada durante a maltagem e a etapa inicial de maltagem. Aplicação de catalase nos processos de fermentação é bem conhecida na arte (EP1122303).

5 Contudo, aplicações da arte anterior compreendem o uso de composições de enzima compreendendo catalase bem como glicose oxidase. Pelo uso de composições de enzima compreendendo catalase sem, ou essencialmente sem glicose oxidase é alcançado um efeito positivo aumentado sobre o flavor e/ou a estabilidade de flavor. Sem estar ligado à teoria é crido que o aumento em
10 efeito sobre a estabilidade de flavor alcançado pelo processo da presente invenção pode ser explicado pela quantidade reduzida de produtos de oxidação devido ao H_2O_2 formado pela glicose oxidase.

No contexto da presente invenção o termo “essencialmente sem glicose oxidase” é entendido que a razão de atividade de glicose oxidase para atividade de catalase GODU/CIU em composição de enzima é menor do
15 que 1, preferivelmente menor do que 0,75, tal como menor do que 0,50, menor do que 0,25, menor do que 0,10, menor do que 0,50, menor do que 0,25, menor do que 0,10, menor do que 0,05, menor do que 0,01, menor do que 0,001, menor do que 0,0001, e mais preferivelmente menor do que
20 0,00001. Preferivelmente a atividade de glicose oxidase está abaixo do nível de detecção.

De acordo com a invenção uma composição de enzima compreendendo uma catalase é adicionada durante o processo de fermentação. A composição de enzima deve compreender nenhuma, ou
25 essencialmente nenhuma glicose oxidase. A composição de enzima compreendendo catalase pode ser adicionada em qualquer etapa durante o processo, e.g. no malte, no mosto de cerveja, na cerveja “verde”, e/ou na cerveja fermentada. Preferivelmente a composição de enzima compreendendo catalase é adicionada antes de e/ou durante a etapa de maltagem. A

composição de enzima compreendendo catalase é preferivelmente adicionada na mistura de grão e água, o malte. A catalase pode ser adicionada na quantidade de 0,02-200 mg de proteína enzima (EP)/kg de malte, preferivelmente 0,2-20 mg de proteína enzima (EP)/kg de malte, mais preferivelmente 1-10 mg de proteína enzima (EP)/kg de malte. A catalase pode ser adicionada na quantidade de 1 CIU a 0,01 CIU/kg de malte, preferivelmente 10 CIU a 0,001 CIU/kg de malte, mais preferivelmente 100 CIU a 0,0001 CIU/kg de malte, e ainda mais preferivelmente 1000 CIU a 1000 CIU/kg de malte.

10 Preferivelmente a catalase é uma catalase microbiana, tal como uma catalase isolada de um fungo ou de uma bactéria. Preferivelmente a catalase é derivada de uma cepa de *Scytalidium* sp., preferivelmente *S. thermophilum*, uma cepa de *Aspergillus* sp., preferivelmente *A. niger*, uma cepa de *Micrococcus* sp., preferivelmente *M. luteus*.

15 Preferivelmente a composição de enzima compreendendo catalase sem, ou essencialmente sem glicose oxidase é uma composição de monocomponente resultante da purificação de uma composição de enzima derivada de uma cepa de produção não-recombinante. Métodos para a purificação de polipeptídeos incluindo enzimas são bem conhecidos pela
20 pessoa experiente na arte.

Mais preferivelmente a composição de enzima compreendendo catalase é produzida por técnicas recombinantes. Por técnicas recombinantes pode ser obtida uma composição de enzima compreendendo catalase essencialmente pura, tal como uma composição sem, ou essencialmente sem
25 glicose oxidase. Métodos para produção recombinante de polipeptídeos incluindo enzimas são bem conhecidos pela pessoa experiente.

Composições de enzima comerciais preferidas produzidas por técnicas recombinantes estão disponíveis como Terminox Ultra TM da Novozymes A/S e como Fercolase da Genencor Int. Uma composição de

enzima de monocomponente comercial preferida derivada de *Aspergillus niger* está disponível como Catazyme da Novozymes A/S.

Em uma modalidade preferida a composição de enzima também compreende uma lacase.

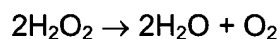
5 A cerveja produzida pelos processos da invenção pode ser de qualquer tipo de cerveja. Tipos de cerveja preferidos compreendem ales, ales fortes, cervejas pretas fortes, cervejas pretas, lagers, bitters, cervejas de exportação, licores de malte, happoushu, cerveja com alto teor de álcool, cerveja com baixo teor de álcool, cerveja de baixa caloria ou cerveja leve.

10 Os processos podem incluir adição de hidrogel de sílica, kieselguhr e/ou poli(vinil-pirrolidona) (PVPP) no mosto fermentado e filtração para formar a cerveja brilhante.

A catalase aplicada durante os processos da presente invenção têm um efeito redutor sobre a concentração de compostos ocasionadores de flavor desagradável importantes. Preferivelmente a concentração de DMS do mosto e/ou da cerveja é reduzida, comparada com o nível em um mosto ou uma cerveja produzido(a) por um procedimento de maltagem convencional, tal como em pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, ou pelo menos 60% em relação ao nível em respectivamente um mosto ou uma cerveja produzido(a) por procedimento de maltagem Congress padrão. Preferivelmente a concentração de T2N do mosto ou da cerveja é reduzida, comparada com o nível em respectivamente um mosto ou uma cerveja por um procedimento convencional, tal como reduzida em pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%,
20 pelo menos 50%, ou pelo menos 60%.

Atividade de catalase

Atividade de catalase pode ser medida em CIU. Catalase catalisa a reação de primeira ordem:



A degradação de peróxido de hidrogênio é monitorada usando espectrofotometria em 240 nm. O tempo demorado para um decréscimo específico em absorbância em uma concentração de H₂O₂ especificada é uma expressão de atividade de catalase. Uma CIU é definida como a atividade de enzima que degradará um μM de H₂O₂ por minuto em pH 7,0 e 25°C, reduzindo a concentração de H₂O₂ de 10,3 para 9,2 mM.

Condições de reação:

Concentração de enzima	aprox. 100 CIU/mL
Concentração de substrato	H ₂ O ₂ 10,3 mM
10 Tampão	fosfato 50 mM
Temperatura	25°C
pH	7,0

Detecção:

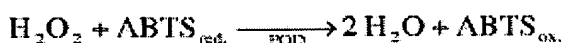
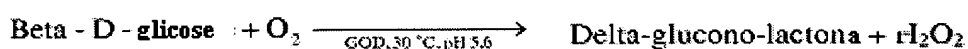
Comprimento de onda	240 nm
15 Faixa de absorbância	0,450 - 0,400
Faixa de tempo	0,267-0,400 minuto (16-24 segundos)

Uma descrição detalhada do método padrão de CIU (EB-SM-0250.02/01) está disponível sob solicitação na Novozymes A/S

Atividade de glicose-oxidase

20 Unidade de glicose-oxidase (GODU) é a quantidade de enzima, que oxida 1 μmol de beta-D-Glicose por minuto. Glicose-oxidase (beta-D-glicose: oxigênio-1-óxido-redutase, EC 1.1.3.4.) oxida beta -D-glicose na presença de oxigênio em delta-glicono-lactona e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio gerado oxida ABTS-R (2,2-Azino-di-

25 (3etil-benziazolina)-6-sulfonato) na presença de peroxidase (POD). Isto gera uma cor “verde”-azul, que é medida fotometricamente em 405 nm.



Condições de reação

	Substrato	Glicose 90 mM (16,2 g/L)
	ABTS	1,25 mM (688 mg/L)
	Glicose-oxidase	0.0061-0.0336 GODU/mL
	Peroxidase (POD)	2930 U/L
5	Tampão	Acetato, 100 mM
	pH	5,60 ± 0,05
	Temperatura	30°C ± 14
	Tempo de reação	36 s (8 x 4,5 s)
	Comprimento de onda	405 nm

10 Uma descrição detalhada do método padrão de GODU (EB-SM-0244.02) está disponível sob solicitação na Novozymes A/S

MATERIAL e MÉTODOS

Espectroscopia de ressonância de spin de elétrons (ESR)

15 Para o prognóstico da estabilidade de flavor de cerveja espectroscopia de ressonância de spin de elétrons (ESR) tem sido usada agora há vários anos, para determinar o denominado tempo lag de uma cerveja via envelhecimento acelerado de cerveja em temperaturas elevadas (60°C). Valor de tempo lag determinado por este método é visto como um critério para o potencial antioxidativo endógeno de uma cerveja, que é primariamente
20 baseado nos compostos redutores (e.g. SO₂, ácido ascórbico), e ele mesmo está diretamente ligado à estabilidade oxidativa da cerveja.

O tempo lag medido por espectroscopia de ESR baseia-se na detecção indireta da geração de radical livre em cerveja durante o envelhecimento acelerado de cerveja. Os radicais livres de vida curta
25 formados podem ser monitorados por aprisionamento com armadilhas de spin e pela detecção dos adutos de spin de vida longa usando espectroscopia de ESR.

Por um certo período de tempo, a geração de radical pode ser retardada pela atividade antioxidativa da cerveja (fase lag). Após a fase lag a

quantidade de radicais começa a aumentar rapidamente com o tempo.

Potencial Antioxidante Endógeno (EAP) é a capacidade natural da amostra de cerveja para extinguir os radicais formados quando aquecida para 63°C e exposta ao oxigênio atmosférico. Quanto mais longa a fase lag no sinal de ESR, mais alto o EAP na cerveja. Segundo este ponto os radicais serão formados naturalmente na cerveja. Com o propósito de comparar cervejas diferentes, o sinal de ESR total ($T_{300-700}$) em um dado tempo é equivalente à quantidade de radicais sendo formados em um certo instante de tempo ainda a 63°C e exposto ao ar atmosférico. Quando menor o sinal menos radicais estão sendo formados na amostra de cerveja.

Índice Antioxidante de Bebida (BAX) definido como $BAX(sp) = \text{valor-EAP} / \text{conteúdo-}\Delta SO_2$ [min*1 / mg] mede a influência de SO_2 adicionado na cerveja, e a interação com antioxidantes naturais presentes na cerveja.

EAP alto bem como BAX alto estão correlacionados com a melhor estabilidade de armazenagem da cerveja (Uchida et al. 1996, J.Am.Brew.Chem. 54 205-211, Andersen et al. 1998. J. Agric. Food Chem. 1998, Vol 46, pp.1272-1275, Andersen et. al. 2000. J. Agric. Food Chem. 2000, Vol 48, pp.3106-3111).

20 Exemplo 1

Um mosto de cerveja foi produzido a partir de um grão compreendendo 35% de malte (Esperanza Riego), 15% de cevada não maltada e 50% grãos de milho. O grão foi mosturado com 0 ppm de catalase (controle, 2 ppm de catalase (como mg/kg DS) e 10 ppm de controle. A catalase foi uma catalase elevadamente purificada de *Aspergillus niger* possuindo uma atividade de 132000 CIU/ml e sem atividade de glicose oxidase detectável. O mosto foi fermentado com levedo de cervejeiro para uma cerveja lager. Na transferência do resto da fermentação os seguintes aditivos foram adicionados na cerveja “verde”: 34 g/Hl de Britesorb e 2 g/Hl

de eritorbato de sódio.

Mosto e cerveja foram analisados; os resultados são mostrados em tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Análise de mosto do grãos mosturados com 0 ppm de catalase (controle), 2 ppm de catalase (como mg/kg DS) e 10 ppm de controle.

	0 ppm	2 ppm	10 ppm
cor (°SRM) antes da ebulição	2,1	1,89	1,92
cor (°SRM) após a ebulição	3,3	3,1	3,16
turbidez antes da ebulição a 60°C	258	198	215
turbidez após a ebulição a 60°C	205	160	142
TBI, após esfriamento do mosto	56	56,8	58,6
Redox: tanômetro	59,11	53,47	52,25
pH	5,28	5,25	5,24
°Plato, %	17,03	16,83	16,93
amargor	32,8	32,5	32,4
ITT, segundo	320	277	237
Teste de Windish	(-)	(-)	(-)

Tabela 2. Análise de cerveja a partir de grãos mosturados com 0 ppm de catalase (controle), 2 ppm de catalase (como mg/kg DS) e 10 ppm de controle.

	0 ppm	2 ppm	10 ppm
pH	4,15	4,1	4,1
cor, °SRM	3,3	3,3	3,3
unidade de amargor	15,7	16,2	16,2
álcool, %P	3,39	3,5	3,52
extrato real, %	3,92	4,02	3,95
extrato original calculado	10,7	10,9	10,8
extrato aparente %	2,4	2,46	2,38
turbidez (°ASBC)	26	26	25
espuma, valor sigma	111	107	109
SO ₂ livre, mg/l	1,25	1,25	1,41
SO ₂ total, mg/l	6,6	6,18	6,85
oxigênio dissolvido (ppb)	185	192	177
dióxido de carbono, % em peso	0,505	0,48	0,52

A cerveja foi submetida à análise sensorial realizada por um painel de teste de flavor treinado. O procedimento para o teste de estabilidade forçada foi o seguinte: 24 horas sob agitação e 3 dias a 38°C. A escala para a estabilidade de flavor vai de 1 a 7. 1 indica nenhum flavor de oxidação e 7 é a cerveja com o grau alto de oxidação. Os resultados são mostrados em tabela 3.

Tabela 3. Estabilidade de flavor. A escala para a estabilidade de flavor vai de

1 a 7, na qual 1 indica nenhum flavor de oxidação e 7 é a cerveja com o grau alto de oxidação.

	Fresca	Forçada	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
Controle	2,55	3,16	3,58	3,40	4,08	4,87
2 ppm	2,54	3,00	2,91	3,10	3,60	4,75
10 ppm	2,4	2,83	2,91	3,00	3,40	3,56

Exemplo 2

5 Uma cerveja alemã clássica do tipo pilsner foi fermentada usando 100% de malte pilsner de cevada. As enzimas foram adicionadas durante a etapa de maltagem seguida por ebulição do mosto, maturação e engarrafamento. As enzimas usadas foram uma composição de catalase de *A. niger* compreendendo atividade secundária de glicose oxidase (Catazyme®), e uma composição de catalase de *Scytalidium thermophilum* sem atividade secundária de glicose oxidase (Terminox Ultra ®).

10 A cerveja engarrafada foi armazenada a 20°C e analisada após 4 e 12 semanas.

Tabela 4. Potencial Antioxidante Endógeno (minutos) e ESR total (sinal total) após armazenagem de 4 semanas e após armazenagem de 12 semanas a 20°C.				
	Após 4 semanas		Após 12 semanas	
	EAP	ESR T ₇₀₀	EAP	ESR T ₃₀₀
Controle sem enzima	184	2,75*10 ⁵	131	3,2*10 ⁵
1325 CIU/kg de catalase de <i>A. niger</i> com GOX ¹	205	2,25*10 ⁵	135	3,6*10 ⁵
1320 CIU/kg de catalase de <i>S. thermophilum</i> sem GOX ²	222	1,8*10 ⁵	176	2,5*10 ⁵

1: Contém 3870 GODU/g (unidades de glicose oxidase);

2: Nível abaixo do nível de detecção de 1,5 GODU/g

15 Exemplo 3

20 Uma cerveja de tipo pilsner foi fermentada usando malte pilsner de cevada e adjunto de amido de milho. As enzimas foram adicionadas durante a etapa de maltagem seguida por ebulição do mosto, maturação e engarrafamento. As enzimas usadas foram uma composição de catalase de *A. niger* compreendendo atividade secundária de glicose oxidase (Catazyme®), uma amostra purificada da composição de catalase de *A. niger* sem atividade de glicose oxidase, e uma composição de catalase de *Scytalidium thermophilum* sem atividade secundária de glicose oxidase (Terminox

Ultra®).

A cerveja engarrafada foi armazenada a 20°C e analisada após 120 dias.

Tabela 5. Índice Antioxidante de Bebida (min*/l/mg SO ₂) e ESR total (sinal total) após 120 dias de armazenagem a 20°C.		
	Cervejas velhas de 120 dias	
	BAX	ESR T₃₀₀
Controle sem enzima	28,9	7,0*10 ⁵
1325 CIU/kg de Catalase de <i>A. niger</i> com GOX ¹	29,5	8,1*10 ⁵
1320 CIU/kg de Catalase de <i>A. niger</i> sem GOX ²	71,9	2,8*10 ⁵
1320 CIU/kg de Catalase de <i>S. thermophilum</i> sem GOX ³	42,6	5,0*10 ⁵

1: Contém 3870 GODU/g (unidades de glicose oxidase);

2: Nível abaixo do nível de detecção de 1,5 GODU/g;

3: Nível abaixo do nível de detecção de 1,5 GODU/g

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir uma cerveja, caracterizado pelo fato de compreender adição de uma composição de catalase no malte, no mosto de fermentação, na cerveja “verde” e/ou na cerveja fermentada de modo a
5 melhorar o flavor e/ou a estabilidade de flavor da cerveja acabada, a citada composição de catalase estando sem, ou essencialmente sem glicose oxidase.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a catalase é uma catalase microbiana, tal como derivável de uma bactéria ou de um fungo.

10 3. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-2, caracterizado pelo fato de que a catalase microbiana é derivável de um fungo, em particular de um fungo pertencente a *Scytalidium* sp., preferivelmente *S. thermophilum*, *Aspergillus* sp., preferivelmente *A. niger*, e/ou *Micrococcus* sp., preferivelmente *M. luteus*.

15 4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a catalase é produzida por técnicas recombinantes.

5. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a composição de enzima adicionalmente compreende uma lacase.

20 6. Uso de composição de enzima, compreendendo catalase sem, ou essencialmente sem glicose oxidase, caracterizado pelo fato de ser em um processo para produzir uma cerveja.

7. Uso de composição de enzima de acordo com a reivindicação precedente, caracterizado pelo fato de que uma lacase está presente.

RESUMO

“MÉTODO PARA PRODUZIR UMA CERVEJA, E, USO DE
COMPOSIÇÃO DE ENZIMA”

5 A presente invenção refere-se a um método de fermentação de
cerveja compreendendo adição de uma composição de enzima
compreendendo catalase sem, ou essencialmente sem, glicose oxidase de
modo a melhorar o flavor e/ou a estabilidade de flavor da cerveja acabada.