



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

(51) Int. Cl.³: C 12 C 9/00
C 12 C 5/00

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein



(12) **FASCICULE DU BREVET** A5

(11)

628 372

(21) Numéro de la demande: 15104/77

(22) Date de dépôt: 09.12.1977

(30) Priorité(s): 11.12.1976 JP 51-148981
31.08.1977 JP 52-104524

(24) Brevet délivré le: 26.02.1982

(45) Fascicule du brevet
publié le: 26.02.1982

(73) Titulaire(s):
Meiji Seika Kabushiki Kaisha, Tokyo (JP)
Kirin Beer Kabushiki Kaisha, Tokyo (JP)

(72) Inventeur(s):
Hidemasa Hidaka,
Yokohama-shi/Hanagawa-ken (JP)
Toru Oneda, Kawasaki-shi/Kanagawa-ken (JP)
Kazuo Yoshioka, Takasaki-shi/Gunma-ken (JP)
Naoki Hashimoto, Takasaki-shi/Gunma-ken (JP)

(74) Mandataire:
William Blanc & Cie conseils en propriété
industrielle S.A., Genève

(54) **Procédé de fabrication de moût de brasserie.**

(57) On soumet une matière amylacée, constituée au moins en majeure partie d'orge, à un traitement de dégradation enzymatique sous l'action d'une amylase de streptomyces et d'une protéase d'*Aspergillus*.

Ce procédé permet de simplifier la fabrication du moût de brasserie, grâce à la suppression du maltage, sans altération des propriétés organoleptiques de la bière finalement obtenue.

REVENDECATIONS

1. Procédé de fabrication du moût de brasserie par traitement enzymatique d'une matière amylacée, caractérisé par le fait que l'on effectue les opérations suivantes:

(1) Préparation d'une matière amylacée constituée au moins en majeure partie d'orge;

(2) Traitement enzymatique de dégradation de cette matière amylacée, sous l'action d'une amylase de *Streptomyces* et d'une protéase d'*Aspergillus*, l'amylase de *Streptomyces* provenant d'une culture aérobie d'un microorganisme producteur d'amylase appartenant au groupe des *Streptomyces* cette amylase ayant sur l'amidon une activité enzymatique dans une gamme optimale de pH comprise entre 4,5 et 5,0, avec une limite d'hydrolyse de l'amidon au moins égale à 75 % de la quantité théorique de maltose et un rapport pondéral glucose maltose au plus égal à 0,06:1, la protéase d'*Aspergillus* étant produite par un microorganisme appartenant au groupe des *Aspergillus*.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que l'orge est à l'état gélatinisé.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que l'orge est à l'état non gélatinisé.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé par le fait que l'on soumet une matière amylacée additionnelle, autre que l'orge, à un traitement de liquéfaction en présence d'une enzyme liquéfiant et que l'on ajoute à la matière amylacée en cours de traitement enzymatique par l'amylase de *Streptomyces* et la protéase d'*Aspergillus* une quantité de cette matière amylacée additionnelle liquéfiée correspondant à une proportion pondérale au plus égale à 80 %, par rapport au poids de l'orge, de manière à continuer le traitement enzymatique.

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que ledit microorganisme producteur d'amylase est le *Streptomyces hygroscopicus* ATCC No. 21722.

6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que ledit microorganisme producteur d'amylase est le *Streptomyces viridochromogenes* ATCC No. 21724.

7. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que ledit microorganisme producteur d'amylase est le *Streptomyces albus* ATCC No. 21725.

8. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que ledit microorganisme producteur d'amylase est le *Streptomyces tosaensis* nov. sp. ATCC No. 21723.

9. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la protéase d'*Aspergillus* est une protéase produite par un microorganisme appartenant au groupe des *Aspergillus*, choisie parmi l'*Aspergillus oryzae*, l'*Aspergillus mellius* et l'*Aspergillus niger*.

10. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que le traitement enzymatique consiste à chauffer la matière amylacée, sous forme d'une bouillie, en présence de l'amylase de *Streptomyces* et de la protéase d'*Aspergillus*, l'ensemble de la bouillie subissant au moins deux étapes de chauffage à des températures différentes.

11. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que le traitement enzymatique consiste à chauffer la matière amylacée, sous forme d'une bouillie, en présence de l'amylase de *Streptomyces* et de la protéase d'*Aspergillus*, en élevant la température de la bouillie par mise à ébullition d'une partie de celle-ci et mélange subséquent de celle-ci avec le rest de la bouillie.

12. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que l'on effectue le traitement enzymatique en présence d'une combinaison de l'amylase de *Streptomyces*, de la protéase d'*Aspergillus* et d'une enzyme auxiliaire autre que cette amylase et cette protéase.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé par le fait que ladite enzyme auxiliaire est choisie dans le groupe comprenant les amylases autres que l'amylase de *Streptomyces*, les pro-

téases autres que la protéase d'*Aspergillus*, les glucanases et les cellulases.

La présente invention a pour objet un procédé de fabrication de moût de brasserie par traitement enzymatique d'une matière amylacée.

L'invention a notamment pour but de permettre la fabrication de moût de brasserie sans nécessiter l'utilisation de malt. Plus précisément, le procédé selon l'invention permet la fabrication de moût, approprié à la fabrication de la bière, en utilisant des enzymes externes. Ce procédé comprend un traitement enzymatique de matières amylacées comme l'orge, en utilisant principalement une amylase produite par un microorganisme appartenant au groupe des *Streptomyces* (ce microorganisme est décrit dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique no. 3 804 717).

Comme on le sait, la fabrication de la bière comprend la fermentation alcoolique de moût houblonné, en présence de levure de bière. Le moût est produit par brassage de malt d'orge et, si nécessaire, d'une matière amylacée additionnelle, sous l'action d'un groupe d'enzymes qui apparaissent dans le malt au cours de l'opération de maltage. Le procédé conventionnel de fabrication de moût de brasserie requiert donc l'exécution d'un procédé dit de «maltage» pour produire le malt par trempage, germination et touraillage de l'orge. Au cours du maltage, différentes matières constitutives de l'orge, comme l'amidon, subissent des modifications et un groupe d'enzymes, qui sont nécessaires pour le brassage sont engendrées.

Au cours du brassage, les matières solubles du malt et de la matière amylacée traditionnelle éventuelle sont extraites et les matières insolubles sont dissoutes et dégradées sous l'action des enzymes du malt.

Le but principal du maltage est de produire un groupe d'enzymes nécessaires pour le brassage. Toutefois, l'opération de maltage est longue, nécessite un appareillage complexe et exige une surveillance et un réglage compliqués.

C'est pourquoi, on a proposé déjà dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique no. 3 81 172 (1963) d'éliminer l'opération de maltage en remplaçant le malt par de l'orge non maltée et des enzymes externes. Depuis cette époque, de nombreuses tentatives ont été effectuées pour parvenir à ce résultat. Pour arriver à produire de la bière ayant un goût excellent, il est nécessaire de produire de moût dont les différents ingrédients sont en proportions bien déterminées. En premier lieu, pour permettre la dégradation de l'amidon qui constitue l'un des processus essentiels de la fabrication de la bière, il est important de produire des sucres fermentescibles et des dextrines en proportions bien déterminées, dans le moût de brasserie, au cours de l'opération de brassage.

Les sucres fermentescibles constituent des éléments essentiels en tant que substances nutritives principales pour la levure de bière. Une quantité insuffisante de tels sucres se traduit par une perturbation de la bonne marche de la fermentation et, par conséquent par un déséquilibre du goût de la bière obtenue. Les dextrines contribuent aux propriétés colloïdales et à la plénitude du goût de la bière. Le réglage de la proportion de sucres fermentescibles et de dextrines du moût de brasserie selon le genre de bière que l'on désire fabriquer est très important pour obtenir une bière ayant d'excellentes propriétés organoleptiques. Toutefois, l'orge non maltée est plus difficile à dégrader que le malt parce que la formation des enzymes et les modifications subies par l'amidon dans les grains d'orge ne sont pas satisfaisantes. C'est pourquoi, jusqu'à présent, il semble que la dégradation enzymatique de l'amidon d'orge pour produire du moût de brasserie n'a pas donné entière satisfaction. Lorsque l'on remplace intégralement l'orge non maltée et l'enzyme externe,

on n'arrive pas à obtenir une dégradation suffisante de l'amidon d'orge, au cours du brassage, comme indiqué ci-dessus. On ne peut pas obtenir une quantité suffisante de sucres fermentescibles. En conséquence, il est encore nécessaire d'utiliser du malt dans le cas du brassage de l'orge en présence d'enzymes externes. A ce sujet, on peut, par exemple, citer les publications suivantes: Eur. Brew. Conv., Proc., 149 (1971); J. Inst. Brewing, 80, 206 (1974); MBAA, TECHNICAL QUARTERLY, 9, 12 (1972); BREWERS' DIGEST, Juillet, 56 (1969) et brevet britannique no. 1 303 644. Le procédé classique de fabrication de moût conformément au procédé de brassage utilisant de l'orge et une enzyme externe est effectué de la manière suivante: on introduit de l'orge, qui constitue la matière première principale, dans une cuve-matière où on la mélange avec de l'eau, du malt et une enzyme externe. On maintient la bouillie ainsi obtenue à une température comprise entre 45 et 50 °C, principalement pour effectuer la dégradation des protéines, on la réchauffe à une température comprise entre 60 et 65 °C, et on la maintient à cette dernière température principalement pour former les sucres fermentescibles. Ce diagramme thermique d'empâtage n'est pas fondamentalement différent de celui que l'on suit lors du brassage conventionnel du malt.

Par ailleurs, on a non seulement procédé à des recherches portant sur le choix d'enzymes externes appropriées au brassage de mélange orge enzymes, mais on a également effectué des essais en vue de modifier les propriétés des grains d'orge de façon que leur constituants notamment l'amidon, soient, aussi aisément dégradés que ceux du malt. On a, par exemple, proposé de soumettre l'orge à un préchauffage de manière à obtenir satisfaction. Dans ce cas, on effectue cependant la saccharification de l'orge liquéfié en y ajoutant une certaine quantité de malt qui joue le rôle de source de β -amylase, car le traitement des grains d'orge à température élevée provoque l'inactivation de la β -amylase présente dans les grains sous forme latente. A ce sujet, on peut citer les brevets américains No. 3 712 820, 3 713 840 et 3 719 500.

On connaît un essai de fabrication de moût de brasserie, sans utiliser de malt, par cuisson d'orge et d'une matière amylacée additionnelle suivie par un traitement enzymatique. Cependant, dans ce cas, du fait que l'on ajoute du sirop de sucre en quantité triple de celle de l'orge (comme décrit dans le brevet japonais publié no. 4 428/65), ce procédé ne consiste pas, strictement parlant, en un remplacement complet du malt par de l'orge et des enzymes.

Bien que, comme décrit ci-dessus, lors de la fabrication de moût de brasserie par traitement enzymatique d'orge, l'une des premières exigences importantes auxquelles on doit satisfaire est que l'atténuation de moût obtenu dans le cas où l'on utilise de l'orge et des enzymes soit comparable à celle que l'on obtient dans le cas du moût conventionnel préparé à partir de malt, il est également très important que la teneur en composés azotés dans le moût obtenu à partir d'orge et d'enzymes soit comparable à celle du moût préparé à partir de malt. En ce qui concerne les composés azotés qui constituent des ingrédients importants au même titre que les hydrates de carbone, il est nécessaire que des quantités suffisantes d'acides aminés soient produites et que la proportion de peptides soit également maintenue à un niveau approprié.

La présence de composés azotés à bas poids moléculaire, notamment d'acides aminés, est essentielle en tant qu'élément nutritif principal de la levure de bière. Si ces composés azotés sont en quantité insuffisante, la fermentation du moût ne se déroule pas de manière normale, ce qui se traduit par un déséquilibre des propriétés organoleptiques de la bière obtenue. D'autre part, les composés azotés de poids moléculaire plus élevé contribuent à l'obtention des propriétés colloïdales appropriées et du bouquet de la bière. En conséquence, lors de la fabrication du moût de brasserie, il est également très impor-

tant, en vue de l'obtention de bière ayant un goût excellent, d'ajuster la proportion en composés azotés à bas poids moléculaire par rapport à celle des composés azotés à poids moléculaire plus élevé à une valeur appropriée.

Toutefois, lorsque l'on met en oeuvre la technique connue de traitement enzymatique de l'orge, le remplacement complet du malt par de l'orge et des enzymes externes entraîne l'obtention d'une composition en composés azotés dans le moût obtenu qui est différente de celle que l'on obtient dans le procédé traditionnel de fabrication du moût à partir du malt. Dans le moût traditionnel obtenu à partir du malt, le rapport de l'azote formolique à l'azote total, qui indique la quantité de composés azotés à bas poids moléculaire, est de l'ordre de 1:3 alors que dans le moût obtenu en remplaçant intégralement le malt par de l'orge et une enzyme externe, ce rapport est de 1:4. A ce sujet, on peut citer la publication suivante: Inst. Brew. Australia and New Zealand Sec. 111(1966).

Lors du traitement enzymatique de l'orge, les composés à bas poids moléculaire contenus dans le moût obtenu ont généralement tendance à être en quantité inférieure à celle que l'on obtient dans le moût traditionnel, comme il est indiqué dans la publication: Eur. Brew. Conv. Proc. Congr. 283(1967), et même si l'on effectue le traitement enzymatique en utilisant une combinaison d'orge et d'enzymes externes renfermant environ 20% de malt, cette tendance persiste. A ce sujet, on peut citer le brevet des Etats-Unis d'Amérique No. 3 713 840; la publication Brewers' Digest, juillet 56 (1969); et la publication Process Biochemistry, août 46 (1970). Par conséquent, dans le traitement enzymatique de l'orge, si l'on essaie d'ajuster le niveau de l'azote total du moût à celui que l'on obtient dans le moût traditionnel préparé à partir de malt, on obtient une quantité insuffisante de composés azotés à bas poids moléculaire qui sont des éléments nutritifs pour la levure de bière.

D'autre part, si l'on essaie d'adapter le niveau de composés azotés à bas poids moléculaire avec celui que l'on obtient dans le moût traditionnel préparé à partir de malt, la quantité d'azote total devient excessive. Il est très difficile d'obtenir de la bière ayant un goût excellent à partir de moût de ce genre dans lequel la teneur en composés azotés est différente de celle que l'on trouve dans le moût traditionnel.

Une partie des coinventeurs de la présente invention ont découvert que des microorganismes appartenant au groupe des Streptomyces produisent une amylase ayant une activité enzymatique particulière, comme décrit dans le brevet japonais publié no. 1 871/74; le brevet des Etats-Unis d'Amérique no. 3 804 717; le brevet britannique no 1 377 223; le brevet canadien no. 973 492 et le brevet français no. 71 38545 (no. de publication 2 110 070). Cette amylase est thermiquement stable et possède une aptitude élevée à la production de maltose ainsi qu'une activité liquéfiante. Toutefois, si on fait réagir directement cette amylase sur l'orge brute, l'atténuation apparente et la teneur en composés azotés du moût que l'on obtient ne sont pas comparables à ceux que l'on obtient dans le moût à partir de malt.

L'invention a pour but d'éliminer les inconvénients qui viennent d'être mentionnés. A cet effet, le procédé selon l'invention est caractérisé par le fait, que l'on effectue les opérations suivantes:

(1) Préparation d'une matière amylacée constituée au moins en majeure partie d'orge;

(2) Traitement enzymatique de dégradation de cette matière amylacée, sous l'action d'une amylase de Streptomyces et d'une protéase d'Aspergillus, l'amylase de Streptomyces provenant d'une culture aérobie d'un microorganisme producteur d'amylase appartenant au groupe des Streptomyces, cette amylase ayant sur l'amidon une activité enzymatique dans une gamme optimale de pH comprise entre 4,5 et 5,0, avec une limite d'hydrolyse de l'amidon au moins égale à 75% de la quantité théori-

que de maltose et un rapport pondéral glucose/maltose au plus égal à 0,06:1, la protéase d'*Aspergillus* étant produite par un microorganisme appartenant au groupe des *Aspergillus*.

Lorsque l'on fait réagir une amylase particulière, à savoir l'amylase de *Streptomyces* sur de l'amidon d'orge gélatinisée, on obtient, sans utiliser de malt, du moût de brasserie dont la valeur de l'atténuation est semblable à celle du moût de brasserie traditionnel préparé à partir du malt. Toutefois, lorsque l'on met en oeuvre le traitement enzymatique de l'orge par l'amylase de *Streptomyces* en mettant simultanément en oeuvre une protéase particulière, à savoir la protéase d'*Aspergillus*, le moût que l'on obtient est comparable au moût traditionnel obtenu à partir du malt, non seulement en ce qui concerne sa teneur en hydrate de carbone, mais également sa teneur en composés azotés. En effet, on obtient ainsi facilement un rapport d'azote formolique à l'azote total de 1:3, qui est comparable à celui que l'on obtient dans le moût traditionnel obtenu à partir du malt. De cette façon, la bière finalement obtenue possède d'excellentes propriétés organoleptiques, qui sont comparables à celles de la bière que l'on fabrique à partir de moût de brasserie traditionnel préparé à partir du malt.

En outre, lorsque l'on utilise la protéase d'*Aspergillus* lors du traitement enzymatique de l'orge par l'amylase de *Streptomyces*, on obtient une valeur élevée de l'atténuation ainsi que du rapport azote formolique à azote total, valeurs qui sont comparables à celle du moût traditionnel, et cela même dans le cas où l'amidon de l'orge n'est pas gélatinisé au préalable.

L'effet obtenue en utilisant une combinaison d'une amylase particulière et d'une protéase particulière semble être critique. En effet, en utilisant des amylases autres que l'amylase de *Streptomyces*, la valeur de l'atténuation n'est pas satisfaisante alors que, avec des protéases d'origine bactérienne, le rapport azote formolique à azote total n'est pas comparable à celui que l'on obtient dans le moût traditionnel préparé à partir du malt.

On peut considérer que les avantages, indiqués ci-dessus, sont inattendus. En effet, d'après l'état antérieur de la technique, on savait que les protéases produites par des bactéries appartenant, par exemple, au groupe des bacillus, étaient tout à fait appropriées à l'utilisation pour le traitement enzymatique de l'orge, comme décrit dans les brevets britanniques nos.

1 202 976; 1 304 005 et 1 303 644, et dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique no. 3 719 500. En fait, ces brevets et d'autres publications (*Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya* XII (6), 897 (1976)) décrivent le fait que ces protéases qui sont produites à partir de moisissures (par exemple du genre *aspergillus*) peuvent être utilisées en combinaison avec une amylase. Toutefois, ces publications ne permettent pas de prévoir le fait qu'une combinaison d'une amylase particulière, à savoir l'amylase de *Streptomyces* et d'une protéase particulière, à savoir la protéase d'*Aspergillus*, peut produire un effet exceptionnel et unique, c'est-à-dire l'obtention simultanée des teneurs appropriées en hydrate de carbone et en composés azotés sans utilisation de malt.

Un autre résultat inattendu consiste dans le fait que la gélatinisation de l'orge n'est pas indispensable pour obtenir une quantité suffisante de sucres fermentescibles dans le moût.

Le procédé selon l'invention est particulièrement avantageux du point de vue industriel, car il permet d'obtenir du moût de brasserie qui est comparable au moût préparé à partir du malt par sa teneur non seulement en hydrates de carbone mais également en composés azotés, sans nécessiter d'effectuer un traitement de gélatinisation de l'amidon de l'orge.

Amylase de Streptomyces

L'amylase de *Streptomyces* que l'on fait réagir sur les matières amylacées dans le procédé selon la présente invention possède une activité enzymatique correspondant à une gamme optimale de pH comprise entre 4,5 et 5,0, avec une limite d'hy-

drolyse de l'amidon au moins égale à 75% de la quantité théorique de maltose et un rapport pondéral glucose/maltose, à partir d'amidon, au plus égal à 0,06:1. Cette amylase est produite par une culture aérobie d'un microorganisme producteur d'amylases appartenant au groupe des *Streptomyces*. Cette amylase et ses propriétés sont décrites dans le brevet japonais publié no. 1 871/74; le brevet des Etats-Unis d'Amérique no. 3 804 717; le brevet britannique no. 1 377 223 le brevet canadien no. 973 492; et le brevet français no. 71 38545. A titre d'exemple de souche de *Streptomyces* producteur d'amylase, on peut citer les souches suivantes:

(1) *Streptomyces auréofaciens*
(FERM* - No. P606)

(2) *Streptomyces flavus*
(FERM - No. P605)

(3) *Streptomyces hygroscopicus* var. *angustomyceticus*
(FERM - No. P607)

(4) *Streptomyces hygroscopicus*
(FERM - No. P602, ATCC** No. 21 722)
date de dépôt ATCC 15 sept. 1971

Cette souche est décrite dans les ouvrages suivants «*The Actinomycetes*», par Waksman, Vol. 2 (1961) et «*Applied Microbiology*», Vol. 10, p. 258-263 (1962). Cette souche est l'une de celles que l'on emploie de préférence pour la mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention.

(5) *Streptomyces viridochromogenes*
(FERM - No. P603; ATCC No. 21 724. Date du dépôt ATCC: 15 septembre 1971)

Cette souche est décrite dans les ouvrages suivants: «*The Actinomycetes*», Vol. 2 (1961), par Waksman et «*Journal of Bacteriology*», Vol. 85, p. 676-690 (1963). Cette souche est l'une de celles que l'on utilise de préférence pour la mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention.

(6) *Streptomyces albus*
(FERM - No. P604; ATCC No. 21 725. Date du dépôt ATCC: 15 septembre 1971)

Cette souche est décrite dans l'ouvrage suivant: «*The Actinomycetes*», par Waksman, Vol. 2 (1961). Cette souche est l'une de celles que l'on utilise de préférence pour la mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention.

(7) *Streptomyces tosaensis* nov. sp.
(FERM - No. P601; ATCC No. 21 723. Date du dépôt ATCC: 15 septembre 1971)

Cette souche a été isolée par certains des co-inventeurs de la présente invention et des détails à son sujet sont indiqués dans le brevet japonais publié, mentionné ci-dessus, no. 1 871/74 ainsi que dans d'autres publications. Cette souche est l'une de celles que l'on utilise de préférence pour la mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention.

*Le numéro FERM indique le numéro de dépôt d'une souche auprès de l'Institut suivant: Fermentation Research Institute, Département de la Science industrielle et de la Technologie du Ministère du Commerce International et de l'Industrie du Japon, Inage, Chiba-Chi, Japon.

**La référence ATCC concerne le numéro de dépôt auprès de l'Organisme suivant: American Typ Culture Collection, Rockville Maryland, U.S.A.

On peut effectuer la culture de souches de microorganismes indiquées ci-dessus, en milieu aérobie, ainsi que le prélèvement et la purification de l'amylase formée et accumulée dans le milieu de culture de toute manière connue appropriée, conformément aux techniques généralement utilisées dans le cas des actinomycètes, par exemple, de la manière décrite dans le brevet japonais publié, mentionné ci-dessus, no. 1871/74 ainsi que dans d'autres publications. Par exemple, on peut inoculer le *Streptomyces hygroscopicus* (ATCC No. 21 722; date du dépôt: 15 septembre 1971).

Dans un milieu d'ensemencement comprenant 2% de farine de maïs, 1% d'embryon de froment et 0,5% de la substance connue sous le nom de «ferma-media» (mise dans le commerce par la Société Trader's Oil Mill Co., Texas, U.S.A.) et ayant un pH de 7,0 à une température de 28 °C, et laisser le microorganisme se développer pendant 24 heures de manière à produire une culture d'ensemencement.

On inocule ensuite cette culture d'ensemencement dans un milieu de culture renfermant 12% d'amidon soluble, 3% de gâteau de soja et 0,2% de phosphate monopotassique, ce milieu ayant un pH de 7,0. On effectue la culture à une température de 35 °C, pendant 90 heures. Le bouillon de culture obtenu est filtré et l'on concentre le filtrat jusqu'à un volume de liquide correspondant environ au cinquième du volume originel. On ajoute ensuite de l'éthanol froid à la solution concentrée, en quantité correspondant au double de celle de la solution, de façon à précipiter l'amylase. On sèche l'amylase précipitée de façon à obtenir l'enzyme brute.

Protéase d'Aspergillus

La protéase que l'on fait réagir sur la matière amylacée est produite par un microorganisme appartenant au groupe des *Aspergillus*. A titre d'exemple, d'*Aspergillus* produisant une telle protéase, on peut citer l'*Aspergillus oryzae*, l'*Aspergillus melius*, l'*Aspergillus niger* et l'*Aspergillus oryzae* 08.1 (FERM 3745; ATCC no. 20498) qui a été isolé par les co-inventeurs de la présente invention. En plus des protéases obtenues en cultivant ces moisissures, on peut également utiliser certaines protéases du commerce. Comme exemple de telles protéases du commerce produites par des microorganismes appartenant à l'espèce *aspergillus*, on peut citer les protéases suivantes: «protéase Amano A» (Amano pharmaceutical Co. Ltd, Japon) «Denazym» (Nagase and Co., Ltd, Japon), «Rhozyme A 4» (Rohm and Haas, Penn, U.S.A.) et «Fermex» (Wallerstein, N.Y., U.S.A.). Ces protéases présentent la propriété commune d'avoir une activité enzymatique correspondant à une gamme optimale de pH comprise entre 6,5 et 7,5 et une température optimale comprise entre 45 et 55 °C, ainsi qu'une gamme de pH de stabilité comprise entre 5,5 et 10,0.

Une caractéristique importante du procédé conforme à l'invention réside dans le fait que ce procédé permet d'éliminer la nécessité d'utiliser une quantité additionnelle de malt grâce au traitement de l'orge gélatinisée par l'amylase de *Streptomyces* ou au traitement de l'orge par l'amylase de *Streptomyces* en combinaison avec la protéase d'*Aspergillus*. Cependant, si nécessaire, on peut également utiliser du malt en combinaison avec les matières premières indiquées ci-dessus tout en restant dans le cadre de l'invention. Entre également dans le cadre de l'invention le remplacement de l'usage additionnel du malt lui-même par l'utilisation d'une petite quantité de diastase extraite du malt ou bien l'utilisation d'autres amylases, protéases, cellulases, glucanases et enzymes analogues, combinées avec l'utilisation de l'amylase de *Streptomyces* (et de la protéase d'*Aspergillus*).

Matières amylacées

Les matières amylacées que l'on traite par l'amylase de *Streptomyces* seules ou en combinaison avec la protéase d'*Aspergillus*, renferment une quantité prédominante d'orge. Le terme «renferment une quantité prédominante d'orge» signifie que la matière amylacée renferme, en plus de l'orge, une quantité pondérale correspondant au maximum à 4%, par rapport à l'orge, d'une matière amylacée autre que l'orge, telle que l'amidon, le riz, le maïs, le kaoliang et la pomme de terre, et plus particulièrement de l'amidon provenant de céréales non germées.

On peut, éventuellement, faire subir à l'amidon d'orge un traitement préalable de gélatinisation.

Dans le cas où l'on utilise une quantité additionnelle d'une matière amylacée autre que l'orge, on peut effectuer, à titre facultatif, un traitement de gélatinisation préalable de cette matière amylacée additionnelle. Dans le cas où la matière amylacée additionnelle est gélatinisée, le traitement de gélatinisation de cette matière peut être effectué soit simultanément avec un traitement de gélatinisation éventuel de l'orge, soit de manière séparée.

Le traitement de gélatinisation en question peut être effectué de toute manière appropriée permettant la gélatinisation de matières amylacées. Par exemple, on peut procéder à la cuisson de l'orge sous forme de grains ou de gritz. L'opération de cuisson en question consiste à chauffer l'orge en présence d'eau, la quantité d'eau correspondant au moins à la moitié, en poids, de celle de l'orge, sous pression et à une température au moins égale à 100°, de préférence comprise entre 110 et 130 °C, pendant au moins 20 minutes, de préférence pendant une durée comprise entre 30 et 60 minutes. On peut également effectuer la cuisson à la vapeur.

Comme autre exemple de traitement de gélatinisation on peut citer un traitement effectué dans une extrudeuse à température élevée sous pression. Une telle extrudeuse comprend, comme organe principal, un dispositif de chauffage permettant de chauffer et de plastifier la matière soumise au traitement ainsi qu'un système de vis permettant de faire avancer la matière plastifiée sous pression (voir, par exemple, la publication suivante: Ind. Eng. Chem. 45 970 (1953)). On peut gélatiniser l'orge, sous forme de grains ou de gritz, dans une extrudeuse à température élevée et sous pression. La quantité de matières amylacées additionnelles correspondant au maximum 80% en poids, par rapport à l'orge, peut également être gélatinisée avec l'orge.

Après la mise en œuvre du traitement de gélatinisation, on soumet l'orge, à l'état humide ou après son séchage (par exemple avec un taux d'humidité n'excédant pas 5% en poids), au traitement enzymatique conformément au procédé selon l'invention.

En outre, la «matière amylacée» utilisée pour la mise en œuvre du procédé selon l'invention peut être une matière amylacée ayant subi divers traitements, en particulier un traitement enzymatique, en plus du traitement de gélatinisation. Par exemple, on peut effectuer un traitement enzymatique par une α -amylase, une cellulase ou une protéase, en même temps que le traitement de gélatinisation ou bien avant ou après ce traitement. Conformément à un exemple de mise en œuvre du procédé selon l'invention, on soumet une matière amylacée à une cuisson en présence d'une α -amylase de façon à produire la gélatinisation et la liquéfaction simultanées de cette matière. Plus particulièrement, on peut mélanger de l'orge et une quantité éventuelle d'une matière amylacée additionnelle correspondant à un pourcentage pondéral au plus égal à 5% par rapport à l'orge, à une quantité d'eau correspondant à 2 à 4 fois la quantité du mélange de matières solides, de manière à former une bouillie. Ensuite, on ajoute à cette bouillie une quantité d' α -amylase correspondant à 0,1 à 0,3% de la quantité totale de matières amylacées, sur base sèche, et l'on chauffe la bouillie ainsi obtenue à une température comprise entre 70 et 90 °C, pendant une durée comprise entre 5 et 30 minutes, de manière à provoquer la liquéfaction de l'amidon. Après quoi, on soumet la bouillie à une cuisson à une température comprise entre 100 et 120 °C, pendant une durée comprise entre 5 et 30 minutes, de manière à achever la liquéfaction de l'amidon.

Processus d'empâtage (traitement enzymatique de la matière amylacée).

Pour provoquer la mise en réaction de l'amylase de *Streptomyces* ou du mélange de cette amylase et de la protéase d'*Aspergillus* avec la matière amylacée préparée de la manière dé-

crite ci-dessus, on peut procéder à un traitement d'empâtage ou à tout autre traitement approprié analogue à ceux que l'on effectue lors de la fabrication de la bière par le procédé usuel dans lequel on utilise un mélange d'orge et d'enzyme.

Par exemple, on peut effectuer le brassage par infusion selon lequel on chauffe la totalité de la bouillie (appelée maische) à un chauffage en présence d'une enzyme dans une cuve-matière unique, sans fractionnement de la bouillie. Dans ce cas, on effectue le chauffage soit en commençant à la température la plus basse de la gamme de chauffage et en élevant progressivement la température, soit en commençant à la température la plus élevée de la gamme de chauffage et en abaissant graduellement la température.

On peut également utiliser le procédé de brassage par décoction. Selon ce procédé, on chauffe la bouillie en présence d'une enzyme dans une cuve-matière mais on prélève une fraction de la bouillie et on la cuit à ébullition dans une chaudière. On ramène ensuite bouillante la partie de la maische traitée dans la chaudière dans la cuve-matière ce qui provoque l'élévation de la température de l'ensemble de la bouillie.

Plus particulièrement, par exemple, on ajoute l'amylase de *Streptomyces* en quantité correspondant à 1 à 8 mg par gramme d'orge au mélange d'eau chaude et de matière amylacée qui a été, au besoin, préalablement gélatinisée et liquéfiée de la manière décrite ci-dessus, et, si nécessaire, on ajoute à la bouillie une quantité de protéase d'*Aspergillus* correspondant à 0,5 à 5,0 mg par gramme d'orge, ou une quantité de papaïne qui joue le rôle d'enzyme protéolytique, correspondant à 1 à 4 mg par gramme d'orge, et une quantité de cellulase correspondant à 1 à 4 mg par gramme d'orge. On maintient la bouillie ainsi obtenue à une température comprise entre 45 et 55 °C, pendant une durée comprise entre 30 et 90 minutes et on la porte ensuite à une température comprise entre 60 et 65 °C, et on la maintient à cette température pendant une durée comprise entre 30 et 60 minutes. On prélève une fraction de cette bouillie (correspondant environ au tiers à la moitié de l'ensemble de la bouillie) et on la porte à ébullition dans une chaudière (chaudière de brassage) pendant une durée comprise entre 5 et 10 minutes et finalement on la ramène dans la cuve matière. Pendant cette opération, on maintient la bouillie restant dans la cuve-matière à une température comprise entre 60 et 65 °C. De cette façon, on peut produire un moût de brasserie permettant de fabriquer une bière ayant un bon goût. On peut effectuer à deux reprises les opérations d'ébullition décrites ci-dessus. Par exemple, après la première opération, on peut chauffer la bouillie combinée à une température comprise entre 70 et 75 °C et, on peut ensuite prélever une quantité correspondant environ à $\frac{1}{3}$ à $\frac{1}{2}$ du volume de la bouillie et la porter à nouveau à ébullition pendant 5 à 10 minutes. On maintient le reste de la bouillie à une température comprise entre 70 et 75 °C, pendant 20 à 40 minutes et, ensuite, on le combine avec la fraction de la bouillie portée à ébullition.

De préférence, la matière amylacée additionnelle autre que l'orge est traitée par l'amylase de *Streptomyces* en même temps que l'orge qui peut être gélatinisée. Cependant, dans ce cas, il n'est pas nécessaire que la matière amylacée additionnelle soit présente dès le début lors du processus d'empâtage de l'orge. Si on le désire, on peut soumettre cette matière amylacée additionnelle à une digestion préliminaire par l' α -amylase et/ou une cellulase et l'introduire ensuite dans le mélange soumis au processus d'empâtage de l'orge. La maische ainsi obtenue est filtrée et on ajuste la teneur en extrait du filtrat (moût doux) à la valeur désirée (par exemple, 10–12° plato). Ensuite, on ajoute une quantité appropriée de houblon, par exemple 2 à 5 g/l au moût doux et on met l'ensemble à ébullition pendant une à deux heures. Après quoi, on soumet le moût houblonné ainsi obtenu à la fermentation sous l'action de la levure de bière.

L'invention sera mieux comprise grâce aux exemples détaillés suivants, non limitatifs.

Exemple 1 (comparatif)

On fait cuire sous pression de l'orge brute en présence d'un poids égal d'eau, à une température de 120 °C pendant 30 minutes. Après quoi, on sèche l'orge cuite à l'air chaud, à une température de 85 °C, pendant 6 heures de manière à obtenir de l'orge gélatinisée.

Après broyage de l'orge gélatinisée ainsi obtenue, on place 9 kg d'orge broyée dans une cuve-matière dans laquelle on ajoute 30 litres d'eau chaude à une température de 50 °C, 20 grammes d'amylase de *Streptomyces*, 10 grammes de papaïne et 10 grammes de cellulase. On agite la bouillie ainsi obtenue tout en la maintenant à une température de 50 °C pendant 60 minutes.

D'autre part, on introduit dans une chaudière 3,5 kg d'amidon de maïs, 15 litres d'eau chaude ayant une température de 50 °C et 10 grammes d' α -amylase. On porte le contenu de cette chaudière à une température de 70 °C en 10 minutes et on le maintient à cette température pendant 10 minutes. Après quoi on élève la température du contenu de la chaudière à 100 °C, en 15 minutes, et on le fait bouillir pendant 25 minutes. Pendant cette opération, il se produit la liquéfaction de l'amidon de maïs.

Après exécution de ces opérations, on combine les deux bouillies et l'on chauffe la bouillie résultante à une température de 65 °C et on la maintient à cette température pendant 30 minutes. Après quoi, on transfère une quantité correspondant approximativement à 50 % de la bouillie dans une chaudière de brassage et on la porte à ébullition. On maintient le reste de la bouillie à une température de 65 °C pendant 30 minutes dans la cuve-matière. Au cours de cette opération on a essentiellement obtenu la formation de sucres fermentescibles.

A la fin du processus d'empâtage, on combine les bouillies contenues dans la cuve-matière et dans la chaudière de brassage et on les porte à une température de 80 °C. Ensuite, on filtre la bouillie et on traite le gâteau ainsi obtenu, avec de l'eau chaude. Après ajustage de la teneur en extrait dans le moût doux ainsi obtenu, on fait subir au moût une ébullition en présence de houblon. Le moût houblonné ainsi obtenu est ensuite refroidi et soumis à la fermentation en présence de levure de bière. On procède ensuite à la fermentation, à la maturation, à la filtration et à la mise en bouteille, conformément au procédé traditionnel de fabrication de la bière.

Exemple 2 (comparatif)

On ajoute 9 kg d'orge broyée, 3,5 kg d'amidon de maïs, 10 g d' α -amylase et 5 g de cellulase à 50 litres d'eau chaude ayant une température de 50 °C, et on maintient la bouillie ainsi obtenue à une température de 50 °C pendant 30 minutes puis on la chauffe à 90 °C en 10 minutes, on la maintient à cette température pendant 10 minutes et on la porte ensuite à ébullition pendant 30 minutes. On refroidit ensuite la bouillie à une température de 50 °C et on y ajoute 20 g de l'amylase de *Streptomyces*, 10 g de papaïne et 10 g de cellulase. Ensuite on maintient la bouillie à une température de 50 °C pendant 30 minutes puis on la porte à une température de 65 °C.

Après quoi, on procède de la manière décrite dans l'exemple 1 mais, lorsque l'on ajoute l'amylase de *Streptomyces* et les autres enzymes, on utilise 5 g de diastase comme enzyme auxiliaire en plus de l'amylase de *Streptomyces*.

Exemple 4 (comparatif)

On procède de la manière décrite dans l'exemple 2, mais, lors de l'addition de l'amylase de *Streptomyces* et des autres enzymes, on utilise également, en plus de l'amylase de *Streptomyces* 5 g de diastase en tant qu'enzyme auxiliaire.

Exemple 5 (comparatif)

On soumet de l'orge brute à un broyage grossier et à un traitement de gélatinisation dans une extrudeuse. On soumet ensuite l'orge gélatinisée ainsi obtenue à un traitement enzymatique de la manière décrite dans l'exemple 1.

Exemple 6 (comparatif)

On gélatinise séparément de l'orge brute et des gritz de maïs dans une extrudeuse. On place 9 kg d'orge gélatinisée et 3,5 kg de gritz de maïs gélatinisés dans une cuve-matière dans laquelle on ajoute 50 litres d'eau chaude ayant une température de 50 °C ainsi que le même mélange d'enzyme que celui qui est décrit dans l'exemple 1. On maintient la bouillie ainsi obtenue à une

température de 50 °C pendant 60 minutes, puis, on la porte à une température de 65 °C.

Après quoi, on traite la bouillie de la manière décrite dans l'exemple 1. La composition des moûts obtenus en procédant conformément aux exemples 1, 2, 3 et 4 décrits ci-dessus, est indiquée dans le tableau I.

Dans le tableau I, les teneurs en hydrate de carbone indiquées correspondent à des résultats de mesure effectués par une méthode de filtration de gel (comme décrit dans la publication suivante: Am. Soc. Brew. Chem. Proc. 154, 1970) et les autres quantités indiquées dans ce tableau ont été déterminées conformément à la méthode dite EBC (décrite dans la publication Analytica EBC 3ème édition, 1975).

Tableau I

*Composition du moût

Moût	Exemple 1	Exemple 2	Exemple 3	Exemple 4	**Moût de référence
Valeur de l'atténuation apparente, %	84.4	83.2	86.5	85.1	83.2–86.7
Monosaccharides, %	8.5	8.3	9.3	9.0	8.4–10.5
Disaccharides, %	49.2	49.1	50.8	51.0	49.8–51.9
Trisaccharides, %	17.3	16.8	16.2	15.9	15.2–16.7
Sucres fermentescibles, %	75.0	74.2	76.3	75.9	73.4–78.5
Oligosaccharides, %	9.3	9.3	9.1	8.7	8.6–10.5
Dextrine, %	15.7	16.5	14.6	15.4	12.9–16.1
Azote total, mgN/100ml	80.2	81.0	83.3	84.6	76.2–84.7

* Les valeurs indiquées sont relatives à la composition d'un moût titrant 11 °P.

** On a utilisé cinq sortes de malt différentes au lieu de l'orge et des enzymes utilisées dans l'exemple 1.

Comme on peut le voir d'après le tableau I, la teneur en hydrates de carbone du moût obtenu par traitement d'orge gélatinisée par l'amylase de *Streptomyces*, de la manière décrite dans les exemples 1 et 2, convient pour la fabrication de la bière.

Le goût de la bière fabriquée à partir du moût obtenu en procédant de la manière décrite ci-dessus a été comparé avec celle d'une bière de référence préparée à partir du malt, cette comparaison étant effectuée en procédant à un test de dégustation (test triangulaire). Une équipe composée de 20 goûteurs n'a pas décelé une différence essentielle entre la bière préparée à partir du moût obtenu comme décrit ci-dessus et la bière de référence. En outre, la bière fabriquée comme décrit ci-dessus

possède un goût de malt, elle est exempte de toute odeur de grains et de diacétyle. Au contraire, la bière fabriquée à partir de moût obtenu selon le procédé traditionnel de traitement enzymatique de l'orge ne possède nullement ces bonnes caractéristiques organoleptiques.

Exemple 7 (comparatif)

On traite de l'orge, ou de l'orge gélatinisée, par une enzyme en quantité correspondant à l'activité saccharifiante du malt en suivant le diagramme de température indiqué dans l'exemple 1. La valeur de l'atténuation apparente des moûts ainsi obtenus est indiquée dans le tableau II.

Tableau II

Valeur de l'atténuation du moût (%)

Enzyme	Amylase de	Produit enzymatique du	Produit enzymatique du	*Malt
Matière première	<i>Streptomyces</i>	commerce	commerce	(Référence)
		A	B	
Orge + amidon de maïs	76	80	72	—
Orge gélatinisée + amidon de maïs	87	73	53	—
Malt + amidon de maïs (Référence)	—	—	—	82–87

* On utilise cinq sortes de malt différentes en remplacement de l'orge et des diverses enzymes indiquées dans l'exemple 1.

On voit, d'après le tableau II, que lorsque l'on traite de l'orge gélatinisée par l'amylase de *Streptomyces* en tant que principale source d'enzyme, la valeur de l'atténuation du moût

obtenu est comparable à celle que l'on obtient dans le cas du moût de référence, un tel résultat ne pouvant pas être obtenu en utilisant d'autres enzymes.

Exemple 8

On introduit, dans une cuve matière, 9 kg d'orge broyée et 30 litres d'eau chaude ayant une température de 50 °C, ainsi que 15 g de protéase d'*Aspergillus*, 20 g de l'amylase de *Streptomyces* et 10 g de cellulase. On agite la bouillie ainsi obtenue en la maintenant à une température de 50 °C pendant 60 minutes, de façon à obtenir essentiellement la formation de composés azotés.

D'autre part, on introduit dans une chaudière de brassage 3,5 kg d'amidon de maïs, 15 litres d'eau chaude ayant une température de 50 °C et 10 g d' α -amylase. On porte le contenu de la chaudière à une température de 70 °C en 10 minutes. Après quoi, on chauffe la bouillie à une température de 100 °C en 15 minutes et on la maintient à ébullition pendant 25 minutes. Au cours de cette opération, il se produit la liquéfaction de l'amidon de maïs.

Après exécution de ces opérations, on rassemble les deux bouillies, on les chauffe à une température de 65 ° et on les maintient à cette température pendant 30 minutes. Après quoi, on transfère environ la moitié du volume de la bouillie dans la chaudière de brassage et on la porte à ébullition. On maintient le reste de la bouillie dans la cuve-matière à une température de 65 °C, pendant 60 minutes. Au cours de cette opération, il se forme essentiellement des sucres fermentescibles.

A la fin du processus d'empâtage, on rassemble les bouillies de la cuve-matière et de la chaudière de brassage, on chauffe l'ensemble à une température de 80 °C, et on procède à sa filtration. Après ajustement de la teneur du moût doux ainsi obtenu, on fait bouillir le moût en présence de houblon. Le moût houblonné ainsi obtenu est ensuite refroidi et soumis à la fermentation en présence de levure de bière. On procède finalement à la fermentation, maturation, filtration et mise en bouteilles, de la manière traditionnelle, de façon à obtenir la bière.

Exemple 9

On ajoute 9 kg d'orge broyée, 3,5 kg d'amidon de maïs, 10 g d' α -amylase et 5 g de cellulase à 50 litres d'eau chaude ayant une température de 50 °C. On maintient la bouillie ainsi obtenue à une température de 50 °C, pendant 30 minutes, puis on la chauffe à une température de 90 °C en dix minutes et on la maintient à cette température pendant 10 minutes et, finalement, on la porte à ébullition pendant 30 minutes. Après quoi, on refroidit la bouillie ainsi obtenue à une température de 50 °C et on y ajoute 15 g de protéase d'*Aspergillus*, 20 g d'amylase de *Streptomyces*, 10 g de cellulase et 10 g de β -glucanase. On maintient ensuite la bouillie à une température de 50 °C, pendant 30 minutes, et finalement on la porte à une température de 60 °C.

On procède ensuite de la manière décrite dans l'exemple 8.

Exemple 10

On procède de la même façon que dans l'exemple 8, mais en utilisant, au lieu d'orge brute, de l'orge gélatinisée sous pression dans une extrudeuse.

Exemple 11

On procède de la même façon que dans l'exemple 8, mais, après chauffage de la bouillie à la température de 65 °C, on maintient l'ensemble de la bouillie à cette température pendant 90 minutes.

La composition des moûts obtenus en procédant de la manière décrite dans les exemples 8 à 11 est indiquée dans le tableau III.

L'analyse des moûts a été effectuée conformément à la méthode EBC (Analytica EBC, 3ème édition, 1975).

Tableau III

*Composition du moût

Moût	Exemple 8	Exemple 9	Exemple 10	Exemple 11	**Référence
Azote total (mgN/100ml)	80.8	79.8	82.1	82.5	76.2–84.7
Azote formolique (mgN/100ml)	25.6	25.7	25.5	26.7	23.9–27.0
Azote formolique/Azote total (%)	31.7	32.2	31.1	32.4	30.9–32.7
Valeur de l'atténuation (%)	83.9	85.3	84.7	85.0	83.2–86.7

* Les valeurs indiquées sont relatives à un moût titrant 11 °P.

** On a utilisé cinq sortes de malt en remplacement de l'orge et des enzymes utilisées dans l'exemple 8.

Lorsque l'on utilise la protéase d'*Aspergillus* lors du traitement enzymatique de l'orge par l'amylase de *Streptomyces*, on obtient un moût ayant un rapport azote formolique à azote total comparable à celui d'un moût préparé à partir de malt. Le tableau III indique également que l'on obtient une valeur d'atténuation élevée, en partant d'orge gélatinisée ou non, cette valeur d'atténuation étant comparable à celle que l'on obtient dans le moût préparé à partir du malt, ce qui montre que l'utilisation de la protéase d'*Aspergillus* au cours du traitement enzymatique de l'orge par l'Amylase de *Streptomyces* rend inutile l'opération de gélatinisation de l'orge.

On a effectué un essai de dégustation (essai triangulaire) afin de comparer le goût de la bière préparée à partir du moût

obtenu en procédant conformément au procédé selon l'invention avec celui d'une bière de référence préparée à partir de malt. Une équipe composée de 20 dégustateurs n'a pas décelé de différence essentielle entre la bière obtenue à partir du moût préparé par le procédé selon l'invention et la bière de référence. La bière fabriquée à partir du moût obtenu par le procédé selon l'invention a une saveur de bière maltée et n'a aucun goût de grains et de diacétyl. Ces bonnes propriétés organoleptiques font défaut dans le cas de la bière obtenue conformément au procédé traditionnel de traitement enzymatique.

Le moût obtenu par traitement enzymatique de l'orge par l'amylase de *Streptomyces* a les valeurs d'atténuation indiquées dans le tableau suivant:

Tableau IV

Valeur de l'atténuation du moût			
Matière première	Orge brute + amidon de maïs	Orge gélatinisée + amidon de maïs	Référence ¹⁾
Protéase			
Papaïne	74 % ²⁾	84 % ³⁾	—
Protéase d'Aspergillus	84 % ⁴⁾	85 % ⁵⁾	—
			82–87 %

Remarques:

¹⁾ Référence: on utilise 5 sortes de malt au lieu de l'orge et des enzymes utilisées conformément à l'exemple 1 ou à l'exemple 8.

²⁾ On utilise de l'orge brute au lieu de l'orge gélatinisée utilisée conformément à l'exemple 1.

³⁾ Exemple 1.

⁴⁾ Exemple 8.

⁵⁾ Exemple 10.

L'effet résultant de l'utilisation de la protéase d'Aspergillus avec l'amylase de Streptomyces sur la valeur d'atténuation du moût ne peut pas obtenu dans le cas où l'on utilise d'autres protéases telles que la papaïne, comme indiqué dans le tableau IV.

Exemple 12

Le rapport azote formolique à azote total du moût obtenu en traitant de l'orge et de l'amidon de maïs par différentes protéases en combinaison avec l'amylase de Streptomyces est indiqué dans le tableau V. On voit, d'après le tableau V, que ce rapport n'est comparable à celui du moût préparé à partir de malt que dans le cas où on utilise la protéase d'Aspergillus.

Tableau V

Rapport azote formolique/azote total du moût	
Protéase	Rapport azote formolique/azote total (%) du moût
Protéase bactérienne alcaline	21
Protéase bactérienne neutre	22
Papaïne	25
Bromeline	26
Pancréatine	26

Trypsine	24
Protéase d'Aspergillus orizae	32
15 Protéase d'Aspergillus mellius	31
Protéase d'Aspergillus niger	33
Moût préparé à partir de malt et d'amidon de maïs (Référence*)	31–33
20 * Voir tableau III	

On traite de l'orge brute avec quelques amylases du commerce, en combinaison avec la protéase d'Aspergillus. Le produit du commerce A est constitué par un mélange d'enzyme destiné à la fabrication de la bière et contenant une amylase d'origine bactérienne et le produit commercial B est une amylase bactérienne.

30 Le tableau VI démontre l'incidence de l'utilisation d'amylase de Streptomyces, conformément au procédé qui vient d'être décrit, sur la valeur de l'atténuation du moût.

Tableau VI

35 Valeur de l'atténuation du moût	
Amylase de Streptomyces	84 %
Produit commercial A	79
Produit commercial B	73
Référence (malt)*	82–87

40 L'amylase de Streptomyces a été remplacée par le produit A ou le produit B mentionné dans l'exemple 8.

* Voir tableau IV.