

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 288**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/02** (2006.01)

**C12N 9/52** (2006.01)

**C12C 5/00** (2006.01)

**C12C 7/04** (2006.01)

**C12H 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2016 PCT/EP2016/078051**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2017 WO17085210**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2016 E 16798474 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2024 EP 3377603**

54 Título: **Preparación de una cerveza estable**

30 Prioridad:

**17.11.2015 WO PCT/EP2015/194858**

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

**10.09.2024**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)**

**Het Overloon 1**

**6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**MUTSAERS, JOHANNA, HENRICA, GERDINA,**

**MARIA y**

**HEIJNE, WILBERT, HERMAN, MARIE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 978 288 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

Preparación de una cerveza estable

5 La presente invención se refiere a un proceso para la preparación de una bebida que es estable durante un período de tiempo prolongado.

**Antecedentes**

10 La turbidez es un fenómeno muy conocido en la industria de las bebidas. La turbidez puede estar presente en la cerveza, el vino y el zumo de frutas. La formación de turbidez se puede producir en diferentes etapas durante un proceso de elaboración de cerveza. En «Enzymes in food processing» editado por T. Nagodawithana y G. Reed, 3.<sup>a</sup> edición, Academic press Inc., San Diego, Capítulo V, págs. 448-449, se ha propuesto que la turbidez en la cerveza es el resultado de interacciones entre proteínas y procianidinas polifenólicas de la cerveza. Se explica que en la cerveza  
15 la turbidez a menudo se forma al enfriar la cerveza. La cerveza se fermenta, se madura, se estabiliza en frío y finalmente se envasa a menudo en condiciones enfriadas. Para conseguir aclararla, la cerveza a menudo se filtra mientras está fría. A pesar de la filtración, la cerveza a menudo puede volverse turbia después de envasarla y distribuirla a los clientes y enfriarse de nuevo, por ejemplo, antes de servirla. De hecho, la turbidez se puede formar incluso en la cerveza cuando no está fría o ya no está fría y se pueden desarrollar sedimentos. La formación de  
20 turbidez no es deseable porque la neblina provocada por la formación de turbidez se asemeja a la neblina producida por el deterioro microbiano, lo cual es indeseable, especialmente para las cervezas de tipo *bright*.

El documento WO2002/046381 divulga un proceso para la reducción de la turbidez en una bebida mediante la adición de una endoproteasa específica para la prolina a la bebida. El documento WO2002/046381 divulga además que al  
25 reducir la turbidez con una endoproteasa específica para la prolina, sigue habiendo un contenido elevado de antioxidantes, tales como polifenoles, en la bebida. Se considera que estos polifenoles antioxidantes son valiosos como ingredientes que mejoran la salud.

El documento WO2014202622 divulga polipéptidos obtenidos a partir de *Rasamsonia emersonii*, tales como una endoproteasa específica para la prolina de acuerdo con la SEQ ID NO: 213 del documento WO2014/202622. El documento WO2014202622 proporciona métodos de procesamiento de material vegetal en donde se utilizan los polipéptidos, por ejemplo, para elaborar cerveza, elaborar vino, destilar y cocinar. Por ejemplo, los polipéptidos pueden mejorar la filtrabilidad o claridad, por ejemplo, de las cervezas, el mosto (por ejemplo, que contiene cebada y/o malta de sorgo) o el vino.  
30

El documento WO2014090803 divulga que, cuando se añadieron una endoproteasa específica para la prolina y una polifenol·oxidasa al mosto después de hervir y enfriar el mosto, se produjo una cerveza que fue más estable durante un período prolongado de tiempo en comparación con la cerveza que se preparó cuando se añadió la endoproteasa específica para la prolina o la polifenol·oxidasa al mosto.  
35

Una desventaja de añadir las enzimas de tipo endoproteasa específica para la prolina y/o una polifenol·oxidasa al mosto después de hervir el mosto es que la actividad enzimática puede permanecer en la cerveza final producida, ya que no se puede eliminar toda la actividad enzimática después de la pasteurización de la cerveza.  
40

45 Resulta necesario disponer de un proceso alternativo para producir una cerveza estable.

**Compendio**

50 La presente invención se refiere a un proceso para preparar cerveza que comprende las etapas de

- a) preparar una masa macerada,
- b) separar el mosto de la masa macerada,
- 55 c) hervir el mosto,
- d) fermentar el mosto y
- e) preparar la cerveza,
- 60

en donde una endoproteasa específica para la prolina que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 y una polifenol·oxidasa se ponen en contacto con la masa macerada durante la preparación de la masa macerada y/o con el mosto antes de hervir el mosto.

65 Convenientemente, también se puso de manifiesto que, después de un almacenamiento prolongado, se formó menos turbidez en la cerveza que fue tratada con una endoproteasa específica para la prolina como se divulga en el presente

documento y una polifenol·oxidasa en comparación con una cerveza producida con una de las enzimas por sí sola o sin ninguna de ellas, o en comparación con una cerveza preparada mediante un proceso en donde se utiliza una endoproteasa específica para la prolina que tiene menos de un 80 % de identidad con la secuencia madura de la SEQ ID NO: 2, tal como una endoproteasa específica para la prolina obtenida a partir de *Aspergillus niger*, y una polifenol·oxidasa.

La presente divulgación también se refiere a una cerveza que se puede obtener, por ejemplo, mediante un proceso tal como se divulga en el presente documento, que tiene un valor H90 de entre 0 y 7, cuando se mide después de forzarla a 60 grados centígrados durante 6 días y su almacenamiento posterior a 0 grados centígrados durante 1 día. Además, la cerveza puede tener un valor H25 de entre 0 y 3,5 cuando se mide después de forzarla a 60 grados centígrados durante 6 días y su almacenamiento posterior a 0 grados centígrados durante 1 día.

En el presente documento también se divulga un envase que comprende una cerveza tal como se divulga en el presente documento.

La presente divulgación también se refiere al uso de una endoproteasa específica para la prolina que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 y una polifenol·oxidasa para reducir la turbidez en una cerveza.

Además, la presente divulgación se refiere a una composición que comprende una endoproteasa específica para la prolina que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 y una polifenol·oxidasa.

### **Definiciones**

Un «péptido» se refiere a una cadena corta de residuos aminoacídicos unidos mediante enlaces peptídicos (de tipo amida). El péptido más corto, un dipéptido, consiste en 2 aminoácidos unidos mediante un solo enlace péptido.

El término «polipéptido» se refiere a una molécula que comprende residuos aminoacídicos unidos mediante enlaces peptídicos y que contiene más de cinco residuos aminoacídicos. El término «proteína», tal como se utiliza en el presente documento, es sinónimo del término «polipéptido» y también puede referirse a dos o más polipéptidos. Por lo tanto, los términos «proteína» y «polipéptido» se pueden utilizar indistintamente. Los polipéptidos se pueden modificar opcionalmente (por ejemplo, glicosilar, fosforilar, acilar, farnesilar, prenilar, sulfonar y similares) para añadir funcionalidad. Los polipéptidos que exhiben actividad en presencia de un sustrato específico en ciertas condiciones se pueden denominar enzimas. Se entenderá que, como resultado de la redundancia del código genético, se pueden producir una multitud de secuencias de nucleótidos que codifiquen un polipéptido determinado.

Un «polifenol» se define como un compuesto que tiene una estructura química que comprende al menos dos anillos aromáticos sustituidos con al menos un grupo hidroxilo o que tiene una estructura química que contiene al menos un anillo aromático sustituido con al menos dos grupos hidroxilo. Son ejemplos de polifenoles los taninos y flavonoides, por ejemplo, catequinas, flavonoles y antocianinas.

Las «polifenol·oxidases» son un grupo de enzimas que oxidan mono- o difenoles o derivados de estos. Una polifenol·oxidasa puede pertenecer a la clasificación enzimática (E.C., por sus siglas en inglés) E.C. 1.10.3.1 (catecol·oxidasa), E.C. 1.10.3.2 (lacasa) o E.C. 1.14.18.1 (monofenol·monooxidasa). Las polifenol·oxidases están muy extendidas en la naturaleza y se encuentran en plantas, bacterias y hongos. La polifenol·oxidasa en un proceso como el que se divulga en el presente documento se puede obtener a partir de *Trametes sp.* tales como *Trametes versicolor* y *Trametes villosa*, *Agaricus bisporus*, *Streptomyces coelicolor*, *Pleurotus sp.* tales como *P. ostreatus*, *Pycnoporus*, *Polyporus*, *Myceliophthora thermophila*, *Aspergillus sp.*, *Neurospora* y *Bacillus sp.*

Una «endoproteasa específica para la prolina» (PEP, por sus siglas en inglés) es una proteasa que hidroliza una proteína o péptido en una posición donde la proteína o péptido contiene un residuo de prolina. Una endoproteasa específica para la prolina puede tener actividad de endoproteasa específica para la prolina y/o de oligopeptidasa específica para la prolina (EC3.4.21.26). Una endoproteasa específica para la prolina es preferentemente una enzima que hidroliza un enlace péptido en el extremo carboxi-terminal de residuos de prolina, lo que da como resultado un péptido y/o fragmento de polipéptido con una prolina C-terminal.

Una «enzima pura» es sinónimo de «polipéptido puro» y significa un polipéptido del cual se elimina al menos un componente, por ejemplo, otro material polipeptídico, con el que está asociado de forma natural. El polipéptido puede estar exento de cualquier otra impureza. El polipéptido puede ser al menos un 50 % puro, por ejemplo, al menos un 60 % puro, al menos un 70 % puro, al menos un 75 % puro, al menos un 80 % puro, al menos un 85 % puro, al menos un 80 % puro, al menos un 90 % puro o al menos un 95 % puro, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % según se determina mediante SDS-PAGE o cualquier otro método analítico adecuado para este propósito y conocido por el experto en la técnica. Un polipéptido aislado puede ser producido por una célula hospedadora recombinante.

La expresión «sustancialmente puro» con respecto a los polipéptidos se refiere a un preparado de polipéptidos que contiene como máximo un 50 % en peso de otro material polipeptídico. Los polipéptidos divulgados en el presente documento están preferentemente en una forma sustancialmente pura. En particular, se prefiere que los polipéptidos divulgados en el presente documento estén en «forma esencialmente pura», es decir, que el preparado de polipéptidos esté esencialmente exento de otro material polipeptídico. Opcionalmente, el polipéptido también puede estar esencialmente exento de material no polipeptídico tal como ácidos nucleicos, lípidos, componentes de medios y similares.

La identidad de secuencia u homología de secuencia se utilizan indistintamente en el presente documento. A los efectos de esta invención, se define aquí que, para determinar el porcentaje de homología de secuencia o identidad de secuencia de dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se alinean con el fin de obtener una comparación óptima. Para optimizar la alineación entre las dos secuencias, se pueden introducir huecos en cualquiera de las dos secuencias que se comparan. Tal alineación se puede llevar a cabo en toda la longitud de las secuencias que se están comparando. Como alternativa, la alineación se puede llevar a cabo en una longitud más corta, por ejemplo, en aproximadamente 20, aproximadamente 50, aproximadamente 100 o más aminoácidos. La identidad de secuencia es el porcentaje de coincidencias idénticas entre las dos secuencias sobre la región alineada indicada. El porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch para la alineación de dos secuencias (Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453). Ambas secuencias de aminoácidos pueden ser alineadas por el algoritmo. El algoritmo de Needleman y Wunsch se ha implementado en el programa informático NEEDLE. A los efectos de esta invención, se utilizó el programa NEEDLE del paquete EMBOSS (versión 2.8.0 o superior, *EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite* (2000) Rice, P. Longden, I. y Bleasby, A. *Trends in Genetics* 16, (6) págs. 276-277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Para las secuencias de proteínas, se utiliza EBLOSUM62 para la matriz de sustitución. El experto apreciará que todos estos parámetros diferentes producirán resultados ligeramente diferentes, pero que el porcentaje global de identidad de dos secuencias no se altera significativamente cuando se utilizan algoritmos diferentes.

Después de la alineación con el programa NEEDLE tal como se ha descrito anteriormente, el porcentaje de identidad de secuencia entre una secuencia de consulta y una secuencia de la invención se calcula de la siguiente manera: número de posiciones correspondientes en la alineación que muestran un aminoácido idéntico en ambas secuencias, dividido por la longitud total de la alineación, después de restar el número total de huecos en la alineación. La identidad tal como se define en el presente documento se puede obtener de NEEDLE utilizando la opción NOBRIEF y está marcada en la salida del programa como «identidad más larga».

Las secuencias de proteínas de la presente invención se pueden utilizar además como una «secuencia de consulta» para realizar una búsqueda frente a bases de datos de dominio público para, por ejemplo, identificar a otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Estas búsquedas se pueden realizar utilizando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul *et al.*, (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Se pueden realizar búsquedas de nucleótidos de BLAST con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de la palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Se pueden realizar búsquedas de proteínas de BLAST con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de la palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteínas de la invención. Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase la página de inicio del Centro Nacional de Información Biotecnológica en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

### **Descripción detallada**

La presente invención se refiere a un proceso para preparar cerveza que comprende las etapas de

- a) preparar una masa macerada,
- b) separar el mosto de la masa macerada,
- c) hervir el mosto,
- d) fermentar el mosto y
- e) preparar la cerveza,

en donde una endoproteasa específica para la prolina que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 y una polifenol-oxidasa se ponen en contacto con la masa macerada durante la preparación de la masa macerada y/o con el mosto antes de hervir el mosto.

Sorprendentemente, se ha puesto de manifiesto que, cuando una endoproteasa específica para la prolina que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEQ ID NO: 2 y una polifenol·oxidasa se ponen en contacto con la masa macerada durante la preparación de la masa macerada y/o con el mosto antes de hervir el mosto, se podría producir una cerveza estable durante un período de tiempo prolongado. Sorprendentemente, una cerveza preparada en un proceso como el que se divulga en el presente documento presentó valores de turbidez más bajos en comparación con una cerveza preparada en un proceso en donde hay una endoproteasa específica para la prolina que tiene menos de un 80 % de identidad con la secuencia de polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, por ejemplo, una endoproteasa específica para la prolina obtenida a partir de *Aspergillus niger* y una polifenol·oxidasa presentes durante la maceración o en el mosto antes de hervir el mosto. Los valores de turbidez tal como se utilizan en el presente documento son los valores de H90 y/o H25 medidos después de forzar a una temperatura de 60 grados centígrados durante 6 días y un almacenamiento posterior de la cerveza a 0 grados centígrados durante 1 día.

Un almacenamiento prolongado de la cerveza puede ser una cerveza que se almacena durante al menos un mes, o al menos dos, tres, cuatro, cinco o al menos seis meses, o una cerveza que se almacena de seis a doce meses o una cerveza almacenada de doce a dieciocho meses. La turbidez en la cerveza se puede medir determinando los valores de H90 y H25 expresados en unidades de ECB (siglas en inglés de *European Brewery Convention*) tal como se divulga en la sección Materiales y métodos. Un método común para estimar si una cerveza es estable durante un período prolongado de tiempo consiste en determinar la estabilidad utilizando un método de estabilidad o curado acelerado. En un método de estabilidad acelerada ilustrado en el presente documento, los valores de H90 y H25 en la cerveza se determinan después de mantener la cerveza a una temperatura de 60 grados centígrados durante 6 días y un almacenamiento posterior de la cerveza a 0 grados centígrados durante 1 día. El hecho de mantener la cerveza a una temperatura de 60 grados centígrados durante 6 días también se conoce como forzar la cerveza a una temperatura de 60 grados centígrados durante 6 días. Convenientemente, los valores de H90 en la cerveza después del método de estabilidad o curado acelerado están entre 0 y 7, por ejemplo, entre 0,5 y 5, por ejemplo, entre 1 y 4. Convenientemente, los valores de H25 de la cerveza después del método de estabilidad acelerada están entre 0 y 3, por ejemplo, entre 0,5 y 2.

Se puso de manifiesto que era favorable poner en contacto la endoproteasa específica para la prolina y la polifenol·oxidasa con la masa macerada durante la preparación de la masa macerada y/o con el mosto antes de hervir el mosto, porque después de hervir el mosto no queda actividad enzimática residual en la cerveza final de las enzimas que están presentes en la masa macerada y/o en el mosto. La actividad enzimática residual se mide como una actividad de endoproteasa específica para la prolina en NASU tal como se divulga en la sección de Materiales y métodos.

La preparación de una masa macerada en un proceso tal como se divulga en el presente documento puede comprender preparar una masa macerada a partir de un grano de cereales no malteados, de cereales malteados o de una mezcla de cereales malteados y no malteados. Un grano tal como se utiliza en el presente documento también puede ser una malta. Algunos ejemplos de cereales a partir de los cuales se puede preparar una masa macerada y posteriormente una cerveza son la cebada y el trigo. Además, la masa macerada y posteriormente la cerveza se pueden preparar con materiales adjuntos tales como maíz, arroz, sorgo, avena o yuca.

La maceración, es decir, el proceso de preparación de una masa macerada, normalmente implica pausas (descansos) a ciertas temperaturas, por ejemplo, una pausa a una temperatura de 43 a 51 °C, una pausa a una temperatura de 62 a 65 °C, una pausa a una temperatura de 72 a 74°C y/o una pausa a 77-78 °C.

La puesta en contacto con la endoproteasa específica para la prolina y la polifenol·oxidasa tal como se utiliza en el presente documento puede comprender añadir la endoproteasa específica para la prolina y la polifenol·oxidasa a la masa macerada o al mosto antes de hervir el mosto. Convenientemente, la endoproteasa específica para la prolina y la polifenol·oxidasa se añaden a la masa macerada al inicio de la etapa de preparación de una masa macerada, por ejemplo, en una primera pausa a una temperatura de 43 °C a 51 °C.

En una realización en un proceso tal como se divulga en el presente documento, la puesta en contacto con la endoproteasa específica para la prolina y la polifenol·oxidasa se realiza a una temperatura de al menos 50 °C, 60 °C o 70 °C, por ejemplo, una temperatura de entre 40 °C y 85 °C durante al menos una parte de dicha puesta en contacto. La puesta en contacto con la endoproteasa específica para la prolina y la polifenol·oxidasa se puede realizar durante cualquier período de tiempo adecuado. Por ejemplo, la puesta en contacto con la endoproteasa específica para la prolina y la polifenol·oxidasa se puede realizar durante el tiempo necesario para preparar una masa macerada.

Después de la maceración, el mosto se separa de la masa macerada mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante filtración o a través de un filtro para masa macerada o Lauter Tun.

En el presente documento también se divulga una composición que comprende una endoproteasa específica para la prolina que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 y una polifenol·oxidasa. Convenientemente, una composición tal como se divulga en el presente documento es una masa macerada o un mosto.

En una realización, un proceso tal como se divulga en el presente documento comprende hervir el mosto. El hecho de hervir el mosto desnaturaliza cualesquiera actividades enzimáticas en el mosto, por ejemplo, la actividad de endoproteasa específica para la prolina y/o la polifenol·oxidasa tal como se divulga en el presente documento. Después de hervir el mosto, el mosto se enfría antes de fermentar el mosto. Por consiguiente, un proceso para preparar cerveza comprende una etapa de enfriamiento del mosto. El enfriamiento del mosto normalmente consiste en llevar el mosto a una temperatura de entre 5 °C y 20 °C, tal como entre 8 °C y 18 °C o entre 10 °C y 15 °C. Después de enfriar el mosto, un proceso para preparar cerveza tal como se divulga en el presente documento comprende fermentar el mosto. La fermentación del mosto se inicia normalmente mediante la adición de levadura que convierte los azúcares disponibles en alcohol, lo que también se conoce como fermentación primaria. La fermentación del mosto en un proceso para preparar cerveza se realiza normalmente a una temperatura de entre 5 °C y 20 °C, por ejemplo, entre 8 °C y 18 °C, por ejemplo, entre 10 °C y 14 °C. Después de la fermentación, un proceso para preparar cerveza comprende normalmente una fase de maduración que también se conoce como fermentación secundaria. Durante la maduración, los componentes de sabor indeseables, tales como las dicetonas, se convierten normalmente en componentes de mejor sabor. Después de la maduración, un proceso para preparar cerveza puede comprender normalmente una fase de estabilización. Durante la estabilización, se fomenta la formación de agregados de polifenol·proteína, lo que hace posible que precipiten. Opcionalmente, un proceso para preparar cerveza comprende una etapa de filtración, por ejemplo, después de la estabilización. Normalmente, la cerveza se envasa después de la estabilización y/o filtración, por ejemplo, en una botella, una lata o un barril. Normalmente, un proceso para preparar cerveza también comprende pasteurizar la cerveza.

La cerveza tal como se utiliza en el presente documento puede tener todos los contenidos de alcohol posibles, por ejemplo, de un 0 a un 12 % v/v, tal como de un 1 a un 10 % v/v, o de un 2 a un 8 % v/v, o de un 3 a un 6 %.

En una realización en un proceso tal como se divulga en el presente documento, la endoproteasa específica para la prolina y/o la polifenol·oxidasa permanecen activas a una temperatura de al menos 50 °C, 60 °C, 70 °C, 71 °C, 72 °C, 73 °C, 74 °C, 75 °C, 76 °C, 77 °C o al menos 78 °C.

En una realización, una endoproteasa específica para la prolina tal como se divulga en el presente documento tiene al menos un 60 %, 65 %, 70 %, 75 % o al menos un 80 % de actividad residual cuando se mantiene en un tampón de NaAc 0,1 M de pH 4,5, con NaCl 50 mM a 65 °C durante 15 minutos. Convenientemente, la actividad enzimática se mide con Acetil-AlaAlaPro-para-nitroanilina (Ac-AAP-pNA) como sustrato en tampón de NaAc 0,1 M de pH 4,5, con NaCl 50 mM (NASU).

Convenientemente, una endoproteasa específica para la prolina es un polipéptido que tiene actividad de endopeptidasa específica para la prolina que tiene al menos un 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. La secuencia de polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 comprende o tiene los aminoácidos 36 a 526 de la SEQ ID NO: 2, en donde la metionina en la posición 1 en la SEQ ID NO: 2 se cuenta como 1.

Una endoproteasa específica para la prolina tal como se divulga en el presente documento se puede obtener a partir de *Rasamsonia emersonii*. La expresión «se obtiene» o «se puede obtener» a partir de, con respecto al origen de un polipéptido tal como se divulga en el presente documento, significa que, cuando se lleva a cabo una búsqueda de BLAST con un polipéptido de acuerdo con la presente invención, el polipéptido de acuerdo con la presente invención se puede obtener a partir de una fuente natural, tal como una célula microbiana, de la cual un polipéptido endógeno muestra el porcentaje de identidad u homología más elevado con el polipéptido tal como se divulga en el presente documento.

La endoproteasa específica para la prolina y/o polifenol·oxidasa tienen convenientemente un pH óptimo para la actividad a un pH por debajo de pH 7. Por ejemplo, la endoproteasa específica para la prolina tiene un pH óptimo entre 2 y 7, por ejemplo, entre 3 y 6. La polifenol·oxidasa puede tener un pH óptimo entre 4 y 7. El pH óptimo de la actividad de la endoproteasa específica para la prolina y/o la polifenol·oxidasa se mide de acuerdo con los procedimientos expuestos en la sección de Materiales y métodos.

La proteasa específica para la prolina y/o la polifenol·oxidasa se pueden poner en contacto en cualquier cantidad adecuada y depende, entre otros factores, de la cantidad de proteínas y polifenoles presentes en el material de partida. Una cantidad adecuada de proteasa específica para la prolina puede ser de 500 a 100 000 pNASU/kg, tal como de 1000 a 50 000 pNASU/kg de grano, tal como de 2000 a 40 000 pNASU/kg de grano, tal como de 3000 a 30 000 pNASU/kg de grano. Una cantidad adecuada de polifenol·oxidasa puede ser de 1 a 500 mg/kg, tal como de 2 a 100 mg/kg de grano, tal como de 3 a 50 mg/kg de grano.

Las enzimas endoproteasa específica para la prolina y polifenol·oxidasa tal como se divulgan en el presente documento se pueden producir mediante cualquier proceso de fermentación conocido en la técnica. Las condiciones de fermentación dependen habitualmente del organismo hospedador en donde se producen las enzimas. Las enzimas se pueden expresar en un organismo hospedador adecuado tal como *Bacillus*, *Pichia*, *Trichoderma sp* o *Aspergillus sp.*, tal como *Bacillus subtilis*, *Pichia pastoris*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. La enzima se puede recuperar de los caldos de cultivo mediante métodos muy conocidos, tales

como la precipitación con etanol o sulfato de amonio, extracción en medio ácido, o cromatografía de intercambio aniónico o catiónico. Se puede emplear cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la purificación.

5 Las enzimas endoproteasa específica para la prolina y polifenol·oxidasa utilizadas en un proceso tal como se divulga en el presente documento pueden ser enzimas puras o sustancialmente puras.

10 Un proceso tal como se divulga en el presente documento comprende reducir la turbidez en la cerveza. En esta descripción, las palabras turbidez, opacidad y neblina se utilizan indistintamente. La turbidez, opacidad o neblina se puede formar como resultado de las interacciones proteína-polifenol o polifenol-polifenol.

15 En una realización, la cerveza preparada en un proceso tal como se divulga en el presente documento tiene un valor H90 de entre 0 y 7, tal como entre 1 y 6, tal como entre 2 y 5, cuando se mide después de forzarla a 60 grados centígrados durante 6 días y un almacenamiento posterior a 0 grados centígrados durante 1 día.

20 Una cerveza preparada en un proceso tal como se divulga en el presente documento puede tener además un valor H25 de entre 0 y 3,5, tal como entre 0,5 y 2, cuando se mide después de forzarla a 60 grados centígrados durante 6 días y un almacenamiento posterior a 0 grados centígrados durante 1 día.

25 Se puso de manifiesto que la cerveza preparada en un proceso tal como se divulga en el presente documento era estable durante un almacenamiento prolongado.

30 La presente divulgación también se refiere a una cerveza que se puede obtener mediante un proceso tal como se divulga en el presente documento. Se puso de manifiesto convenientemente que una cerveza de la presente divulgación era estable, es decir, durante su almacenamiento se formó menos turbidez en comparación con una bebida que se había preparado sin ninguna de las enzimas proteasa específica para la prolina ni polifenol·oxidasa ni tampoco proteasa específica para la prolina ni polifenol·oxidasa por sí solas. Además, se formó menos turbidez en la cerveza preparada en un proceso tal como se divulga en el presente documento, en comparación con una cerveza preparada en un proceso en donde se utiliza una endoproteasa específica para la prolina que tiene menos de un 80 % de identidad con una secuencia madura de la SEQ ID NO: 2, por ejemplo, una endoproteasa específica para la prolina obtenida a partir de *Aspergillus niger* (por ejemplo, Brewers Clarex®) y una polifenol·oxidasa. Por consiguiente, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a una cerveza, por ejemplo, una cerveza que se puede obtener mediante un proceso tal como se divulga en el presente documento, que tiene un valor H90 de entre 0 y 7, tal como entre 1 y 6, o entre 2 y 5, o entre 3 y 4, cuando se mide después de forzarla a 60 grados centígrados durante 6 días y un almacenamiento posterior a 0 grados centígrados durante 1 día. Una cerveza tal como se divulga en el presente documento tiene un valor H25 de entre 0 y 3,5, por ejemplo, entre 0,5 y 2 cuando se mide después de forzarla a 60 grados centígrados durante 6 días y un almacenamiento posterior a 0 grados centígrados durante 1 día. Además, no se encontró actividad enzimática en la cerveza final preparada, en donde la actividad enzimática es la actividad de endoproteasa específica para la prolina medida con Acetil-AlaAlaPro-para-nitroanilina (Ac-AAP-pNA) como sustrato en tampón de NaAc 0,1 M de pH 4,5, con NaCl 50 mM (NASU).

40 La cerveza tal como se divulga en el presente documento, por ejemplo, una cerveza que se puede obtener mediante un proceso tal como se divulga en el presente documento, normalmente se envasará. Se puede utilizar cualquier envase adecuado, por ejemplo, una botella, un barril o una lata. La cerveza tal como se divulga en el presente documento también se puede envasar en un tanque de almacenamiento. Por consiguiente, en un aspecto, la presente divulgación proporciona un envase que comprende la cerveza tal como se divulga en el presente documento, por ejemplo, una botella, un barril o una lata que comprende dicha cerveza tal como se divulga en el presente documento. En un aspecto, la presente divulgación también se refiere al uso de una endoproteasa específica para la prolina que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 y una polifenol·oxidasa para reducir la turbidez en una bebida. Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un método para reducir la turbidez en una bebida en donde se utiliza una endoproteasa específica para la prolina que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 y una polifenol·oxidasa. Una bebida tal como se utiliza en el presente documento puede ser una cerveza. El uso de una endoproteasa específica para la prolina que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 y una polifenol·oxidasa para reducir la turbidez o un método para reducir la turbidez tal como se divulga en el presente documento puede comprender un proceso y todas las características de tal proceso tal como se divulga en el presente documento.

## **EJEMPLOS**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Enzimas**

65 Se utilizó una muestra comercial de endoproteasa específica para la prolina de *Aspergillus niger*, Brewers Clarex™. La actividad era de 16 500 pNASU/g.

Se obtuvo una endoproteasa específica para la prolina de *Rasmansonia emersonii* (PEP-R.e.) como se describe más adelante. La actividad del preparado enzimático de PEP-R.e. utilizado en el Ejemplo 3 era de 2600 pNASU/g. La actividad del preparado enzimático de PEP-R.e. en el Ejemplo 4 era de 30 000 pNASU/g.

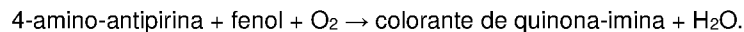
- 5 La lacasa M120 (no menos de 108 000 POU/g de producto) es una polifenol-oxidasa obtenida de Amano Enzyme (Chipping Norton, Reino Unido).

#### Actividad de endoproteasa específica para la prolina (pNASU )

- 10 El sobrenadante del cultivo que contiene PEP tal como se produce en el Ejemplo 1.2 y 1.3 se diluye en un tampón de acetato de sodio 0,1 M a pH 4,5 con NaCl 50 Mm. Se incubaron 100  $\mu$ L de PEP diluida con 100  $\mu$ L de Ac-AAP-pNA 6 Mm (acetil-AlaAlaPro-paranitroanilina de Selleckchem o CPC Scientific; pureza > 95,0 % según el análisis de HPLC) en tampón de NaAc 0,1 M a pH 4,5 con NaCl 50 Mm, en una MTP (siglas en inglés de placa de microtitulación) de fondo plano de 96 pocillos Nunc. Después de 60 minutos a 20 °C, la reacción se detuvo añadiendo 40  $\mu$ L de HCl 1 M.
- 15 La pNA que había sido liberada por la PEP se midió en un espectrofotómetro Tecan MTP a 405 nm (A405) (www.tecan.com). El blanco se preparó mezclando el sobrenadante del cultivo diluido con la solución de sustrato que se había mezclado previamente con la solución de HCl. La actividad se expresa en unidades de pNASU. 1 pNASU es la cantidad de enzima que libera a partir de Ac-AAP-pNA en 1 hora la cantidad de pNA que corresponde a un aumento en la absorción a 405 nm de 1 OD, utilizando las condiciones descritas anteriormente. La A405 no debe estar por
- 20 debajo del valor del blanco al inicio de la reacción, ni por encima de 2,5 al final de la reacción, ni puede la A405 exceder el intervalo lineal del espectrofotómetro que se utiliza.

#### Actividad de polifenol-oxidasa (POU)

- 25 La actividad de lacasa se midió de acuerdo con las instrucciones de Amano (E211: Método de ensayo para la actividad de lacasa = método P-4AA) monitorizando el aumento de la absorción del colorante quinona-imina a 505 nm en las condiciones de ensayo.



- 30 Una unidad de lacasa (POU) se define como la cantidad de la enzima contenida en 1 mL de la mezcla de reacción, cuya absorbancia aumenta a una velocidad de 0,1 por minuto en las condiciones de ensayo.

#### Mediciones de turbidez

- 35 La turbidez o opacidad se midió con un medidor de turbidez de doble ángulo VOS Rota 90/25 de Haffman. Los dos ángulos, 90 y 25 grados, están indicados como H90 y H25. La calibración del medidor de turbidez de doble ángulo VOS Rota 90/25 de Haffman se realizó de acuerdo con el método Analytica EBC 9.29 utilizando estándares AEPA-1. El resultado de la medición de turbidez (valores H90 y H25) se expresó en unidades EBC. EBC son las siglas en inglés de European Brewing Convention (Convención Europea para la Elaboración de Cerveza).
- 40

### EJEMPLO 1. Clonación, expresión y recuperación de una endoproteasa específica para la prolina de *Rasamsonia emersonii* (PEP-R.e.)

#### 45 Ejemplo 1.1. Clonación y Expresión

La secuencia proteica de la endoproteasa específica para la prolina (PEP) de *Rasamsonia emersonii* se muestra en la SEQ ID NO: 2.

- 50 Se diseñó una secuencia de ADN con codones adaptados para la expresión de esta proteína en *Aspergillus niger* que contenía sitios de restricción adicionales para la subclonación en un vector de expresión de *Aspergillus*. La adaptación de los codones se realizó tal como se describe en el documento WO 2008/000632. La secuencia de ADN con codones optimizados para *A. niger* del gen que codifica la proteína PEP-R.e. de la SEQ ID: NO: 2 se muestra en la SEQ ID NO: 1.
- 55

- La secuencia de inicio de la traducción del promotor de glucoamilasa *glaA* se modificó para obtener 5'-CACCGTCAAA ATG-3' (SEQ ID NO: 3) y se utilizó una secuencia de terminación de la traducción óptima 5'-TAAA-3' en la generación del constructo de expresión (tal como también se detalla en el documento WO2006/077258). Se sintetizó completamente un fragmento de ADN que contenía una parte correspondiente al promotor de glucoamilasa y el gen que codificaba PEP-R.e., se purificó y se digirió con EcoRI y PaeI. El vector pGBTOP-16 (Figura 1) se linealizó mediante una digestión con EcoRI/PaeI y el fragmento del vector linealizado se purificó posteriormente mediante una extracción con gel. El fragmento de ADN que contenía la región codificante de PEP-R.e. se clonó en el vector pGBTOP-16, lo que dio como resultado pGBTOP-PEP. Posteriormente, se transformó GBA 306 de *A. niger* (cepa negativa para alfa-amilasa y glucoamilasa  $\Delta$ amyA,  $\Delta$ amyBI,  $\Delta$ amyBII, amplicón BamHI adaptado,  $\Delta$ hdfA,  $\Delta$ pepA,  $\Delta$ glaA) con el vector pGBTOP-PEP linealizado mediante una digestión con NotI, en un protocolo de cotransformación con pGBAAS-4 linealizado, con la cepa y los métodos tal como se describen en el documento WO 2011/009700 y las referencias
- 60
- 65

5 contenidas en él, y se seleccionó en medio que contenía acetamida y se purificó la colonia de acuerdo con procedimientos estándar. La transformación y la selección se realizaron tal como se describe en el documento WO 98/46772 y WO 99/32617. Las cepas que contenían el gen codificante de PEP PEP-R.e. se seleccionaron mediante PCR con cebadores específicos para el gen PEP con el fin de verificar la presencia del casete de expresión pGBTOP-PEP. Se seleccionó un transformante único y posteriormente se replicó en placa para obtener un inóculo de una sola cepa.

### Ejemplo 1.2. Producción de PEP-R.e. en una cepa de *A. niger* en frascos de agitación

10 Se utilizaron esporas frescas de *A. niger* tal como se prepararon en el Ejemplo 1.1. 4 frascos de agitación con 100 mL de medio de fermentación 1 (10 % p/v de sólidos de maíz fermentado, 1 % p/v de glucosa.H<sub>2</sub>O, 0.1 % p/v de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,05 % p/v de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,025 % p/v de Basildon, pH 5,8) en frascos de agitación de 500 mL con deflector se inocularon con 10<sup>7</sup> esporas. Estos precultivos se incubaron a 34 °C y 170 rpm durante 16-24 horas. De los precultivos, se utilizaron 50 mL para la inoculación de 1 frasco de agitación con 1 litro de medio de fermentación 2  
15 (15 % p/v de maltosa, 6 % p/v de Bacto-Soytone, 1,5 % p/v de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1 % p/v de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,1 % p/v de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1 % p/v de L-arginina, 8 ‰ p/v de Tween-80, 2 ‰ p/v de Basildon, 2 % p/v de MES pH 5,1) en un frasco de agitación con un tamaño de 5 litros y se agitó a 34 °C y 170 rpm. Después de 3, 4, 5 y 6 días de incubación, el pH del cultivo se redujo hasta un pH de 5,0 utilizando HCl 2 N y se analizaron muestras de cada uno de estos puntos de tiempo para determinar la actividad de PEP. Se tomaron muestras de 50 mL y se separó el sobrenadante de la biomasa por centrifugación y posterior filtrado. La muestra con la actividad más elevada se utilizó para caracterizar la PEP producida.

### Ejemplo 1.3. Producción de PEP-R.e. en una cepa de *A. niger* en un reactor de tanque agitado

25 Se fermentó *Aspergillus niger* preparado como en el Ejemplo 1.1. en un medio de cultivo adecuado en un reactor de tanque agitado, que comprendía glucosa, extracto de levadura, agente antiespumante y oligoelementos. El oxígeno disuelto, la temperatura y el pH se fijaron en valores adecuados y se midieron periódicamente. Después de la fermentación, la enzima PEP-R.e. se recuperó del caldo de fermentación por filtración. La actividad del preparado enzimático fue de 2600 pNASU/g. El preparado enzimático filtrado se concentró adicionalmente por ultrafiltración y se formuló con glicerol al 50 % p/p. La actividad del preparado enzimático de PEP-R.e. fue de 30 000 pNASU/g.

### EJEMPLO 2. Estabilidad térmica de una endoproteasa específica para la prolina de *Rasamsonia emersonii* (PEP-R.e.)

35 Para evaluar la estabilidad térmica de PEP-R.e., el ensayo de actividad fue precedido por una incubación de alícuotas de 100 µL de una dilución de diez veces del sobrenadante del cultivo producido en el Ejemplo 1.2 en tampón (NaAc 0,1 M de pH 4,5, con NaCl 50 mM) a 55 °C y 65 °C durante 15 minutos en una placa de PCR en una máquina de PCR. Después de la incubación de 15 minutos, las muestras se enfriaron rápidamente hasta 25 °C en la máquina de PCR. Se midió el valor de pNASU/mL para cada muestra. La actividad inicial medida antes de la incubación a temperatura elevada (0 minutos) se utiliza como referencia (100 %) para determinar la actividad residual.

**Tabla 1.** Actividad de endoproteasa específica para la prolina de PEP-R.e. después de una incubación de 15 minutos a 55 °C y 65 °C.

Descripción	Actividad residual después de 15' a 55 °C (pNASU)	Actividad residual después de 15' a 65 °C (pNASU)
PEP-R.e.	105 %	84 %

45 Los resultados de la Tabla 1 muestran que la PEP-R.e. obtenida a partir de *Rasamsonia emersonii* es relativamente estable a una temperatura de 65 grados centígrados.

### EJEMPLO 3. Formación de turbidez en cerveza tratada con endoproteasa específica para la prolina, polifenol-oxidasa y la combinación de estas dos enzimas

50 La cerveza se produce a escala de planta piloto. Se macera a 50 °C, pH 5,4, y con una relación de malta:agua de 1:2,2 y 87 kg de malta.

El esquema de maceración es el siguiente:

- 55
- 50 °C - 15 min
  - 64 °C - 30 min
  - 60 74 °C - 15 min

77 °C - 5 min

Al inicio de la maceración, se añaden las enzimas endoproteasa específica para la prolina y polifenol·oxidasa (PPO) de acuerdo con el esquema presentado en la Tabla 2. También se realiza una maceración sin adición de enzimas.

5 La masa macerada se filtra sobre un filtro para masa macerada. El mosto resultante se hierve durante 1 hora, lo que da como resultado una densidad de aproximadamente 14°P y el objetivo es obtener un amargor de 25 ppm mediante la adición de ácidos iso-alfa al final de la ebullición.

10 La fermentación del mosto se realiza a 12 °C. Después de la fermentación, la cerveza se madura a 0 °C durante 2 semanas y se filtra mediante una filtración en lámina (filtros de lámina Becopad 270).

Después de la filtración y carbonatación con 5,6 g/L de CO<sub>2</sub>, la cerveza se embotella.

15 Las cervezas se analizan para determinar la turbidez inicial y la turbidez después de forzarlas durante 6 días a 60 grados C.

Además, la formación de turbidez en la cerveza durante el almacenamiento se sigue durante varios meses. Además, se analizan los polifenoles.

20 **Tabla 2.** Esquema de adición de Brewers Clarex™, PEP-R.e. y PPO al inicio de los diferentes ensayos de maceración para preparar cerveza.

Prueba n.º	Brewers Clarex™	PEP-R.e.	PPO
1	-	-	-
2	-	-	+
3	+	-	-
4	+	-	+
5	-	+	-
6	-	+	+

La PEP-R.e. utilizada en el presente documento se preparó como se describe en el Ejemplo 1.3.

25 PEP-R.e. y Brewers Clarex™ se suministran en una cantidad de 30 000 pNASU/kg de malta.

La polifenol·oxidasa se suministra en una cantidad de 32 mg/kg de malta.

30 **EJEMPLO 4. Formación de turbidez en cerveza tratada con endoproteasa específica para la prolina, polifenol·oxidasa y la combinación de estas dos enzimas**

De manera similar al Ejemplo 3, la cerveza se produjo en una cervecería piloto a escala de 20 HI. Se maceró a 50 °C, pH 5,4, y con una relación de malta:agua de 1:3 y 350 kg de malta.

35 El esquema de maceración fue el siguiente:

50 °C - 15 min

40 64 °C - 15 min

74 °C - 25 min

45 78 °C - 0 min

Al inicio de la maceración, se añadieron las enzimas endoproteasa específica para la prolina y polifenol·oxidasa (PPO) de acuerdo con el esquema presentado en la Tabla 3. También se realizó una maceración sin la adición de estas enzimas.

50 La PEP-R.e. utilizada en el presente documento se concentró y formuló con glicerol al 50 % p/p preparado como se describe en el Ejemplo 1.3.

PEP-R.e. y Brewers Clarex™ se suministraron en una cantidad de 30 000 pNASU/kg de malta..

55 La polifenol·oxidasa se suministró en una cantidad de 32 mg/kg de malta.

Después de la separación del mosto, el mosto resultante se hirvió, lo que dio como resultado una densidad de aproximadamente 12°P. Se añadió lúpulo de Columbus con un 13,7 % de ácido alfa al inicio de la ebullición.

- 5 La fermentación del mosto se realizó a 12 °C. Después de la fermentación, la cerveza se maduró a -1 °C durante 5 días y se filtró.

Después de la filtración y carbonatación con 5,2 g/L de CO<sub>2</sub>, la cerveza se embotelló. Las botellas se pasteurizaron aplicando 15 PU.

- 10 Las cervezas se analizaron para determinar la turbidez inicial y la turbidez después de forzarlas a 60 grados centígrados durante 6 días y un almacenamiento posterior a 0 grados centígrados durante 1 día.

- 15 Los datos de la Tabla 3 muestran que la cerveza preparada después de la adición de PEP-R.e. y polifenol·oxidasa a la masa macerada presentó la menor formación de turbidez (valores de H90 y H25). La cerveza preparada en un proceso en donde se añadió PEP-R.e. y polifenol·oxidasa durante la maceración dio como resultado un valor de H90 de dos a tres veces más bajo y un valor de H25 aproximadamente 8 veces más bajo en comparación con la cerveza preparada con Brewers Clarex® y polifenol·oxidasa.

- 20 **Tabla 3.** Formación de turbidez (valores de H90 y H25 en unidades EBC) en cerveza preparada después de la adición de Brewers Clarex™, PEP-R.e. y/o PPO durante la maceración. Los valores de H90 y H25 se midieron después de forzar durante 6 días a 60 grados C y un almacenamiento posterior a 0 grados C durante 1 día.

Prueba n.º	Brewers Clarex™	PEP-R.e.	PPO	H90 (unidades EBC*)	H25 (unidades EBC*)
1	-	-	-	16,9	24,7
2	-	-	+	13,2	18,3
3	+	-	-	13,1	13,1
4	+	-	+	9,6	8,8
5	-	+	-	7,1	3,7
6	-	+	+	3,6	1,0

\*Unidades EBC: Unidades de turbidez recomendadas por la Convención Europea para la Elaboración de Cerveza (EBC)

**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso para preparar cerveza que comprende las etapas de
- 5 a. preparar una masa macerada,
- b. separar un mosto de la masa macerada,
- 10 c. hervir el mosto,
- d. fermentar el mosto y
- e. preparar la cerveza,
- 15 en donde una endoproteasa específica para la prolina que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 y una polifenol·oxidasa se ponen en contacto con la masa macerada durante la preparación de la masa macerada y/o con el mosto antes de hervir el mosto.
- 20 2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha puesta en contacto se realiza a una temperatura de al menos 50 °C, 60 °C o 70 °C durante al menos parte de dicha puesta en contacto.
3. Un proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2, en donde la endoproteasa específica para la prolina tiene al menos un 60 %, 65 % 70 %, 75 % o al menos un 80 % de actividad residual cuando se mantiene en un tampón de NaAc 0,1 M de pH 4,5, con NaCl 50 mM a 65 °C durante 15 minutos.
- 25 4. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la cerveza comprende menos turbidez en comparación con una cerveza preparada mediante un proceso en donde una endoproteasa específica para la prolina que tiene menos de un 80% de identidad con una secuencia madura de la SEQ ID NO: 2 y una polifenol·oxidasa se ponen en contacto con la masa macerada durante la preparación de la masa macerada y/o con el mosto antes de hervir el mosto.
- 30 5. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la cerveza tiene un valor H90 de entre 0 y 7, cuando se mide después de forzarla a 60 grados centígrados durante 6 días y un almacenamiento posterior a 0 grados centígrados durante 1 día.
- 35 6. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la cerveza tiene además un valor H25 de entre 0 y 3,5 , cuando se mide después de forzarla a 60 grados centígrados durante 6 días y un almacenamiento posterior a 0 grados centígrados durante 1 día.
- 40 7. Uso de una endoproteasa específica para la prolina que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 y una polifenol·oxidasa para reducir la turbidez en una bebida.
8. Una composición que comprende una endoproteasa específica para la prolina que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 y una polifenol·oxidasa.
- 45 9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la composición es una masa macerada o un mosto.

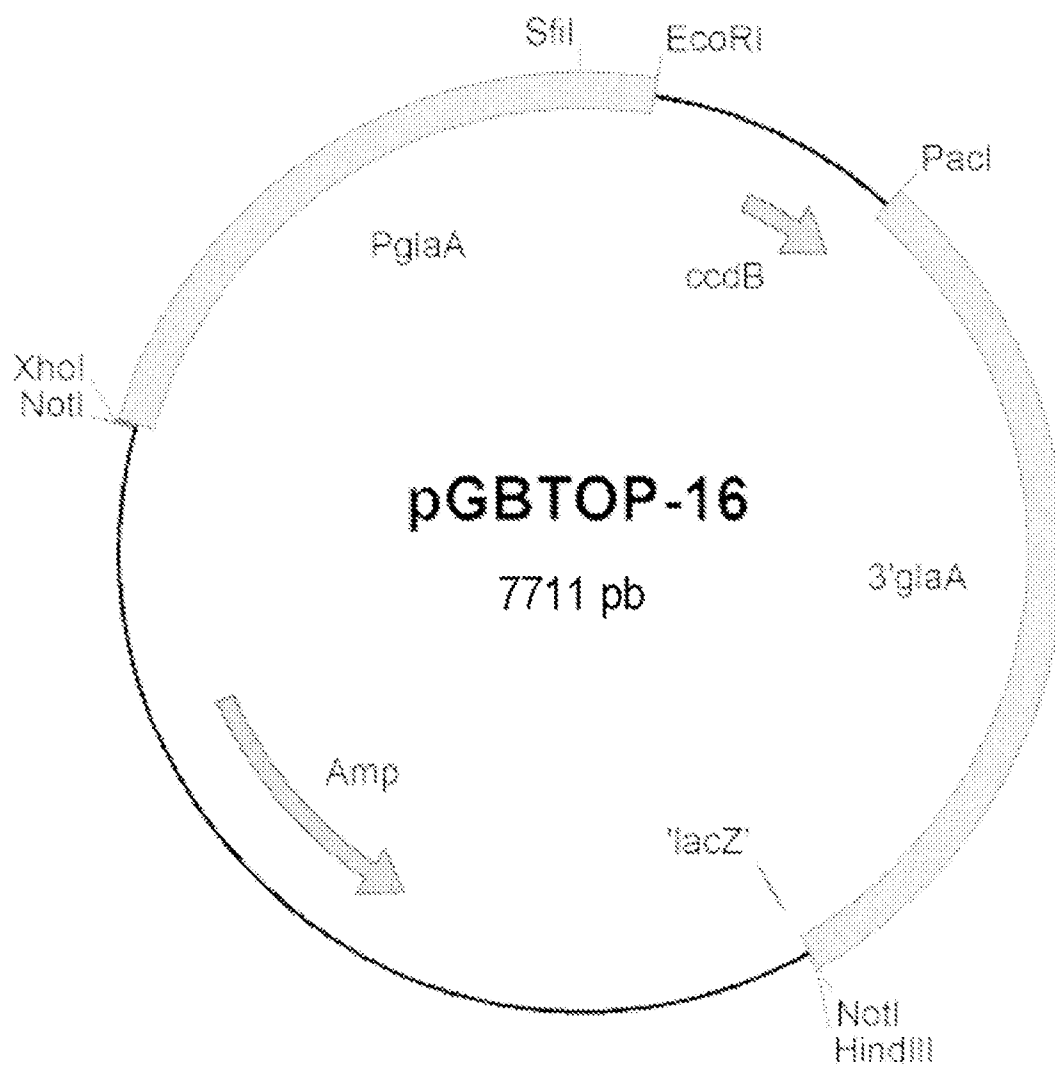


Fig. 1