



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

(21) **PI0708833-7 A2**

(22) Data de Depósito: 03/04/2007
(43) Data da Publicação: 14/06/2011
(RPI 2110)



★ B R P I 0 7 0 8 8 3 3 A 2 ★

(51) Int.Cl.:
C12C 7/00 2006.01
C12P 19/00 2006.01
C12P 19/14 2006.01
C12P 7/00 2006.01

(54) Título: **PROCESSOS PARA A PRODUÇÃO DE UM MOSTO DE CERVEJEIRO E PARA A PRODUÇÃO DE CERVEJA**

(57) Resumo: PROCESSOS PARA A PRODUÇÃO DE UM MOSTO DE CERVEJEIRO E PARA A PRODUÇÃO DE CERVEJA. A presente invenção fornece processos para a produção de mosto e cerveja de um cereal suplemento de amido granular macerado em uma temperatura abaixo da temperatura de gelatinização do referido amido.

(30) Prioridade Unionista: 04/04/2006 DK PA 2006 00483

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

(72) Inventor(es): Niels Elvig

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

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007053222 de 03/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO WO2007/113292 de 11/10/2007



PI0708833-7

1

**"PROCESSOS PARA A PRODUÇÃO DE UM MOSTO DE CERVEJEIRO
E PARA A PRODUÇÃO DE CERVEJA"**

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção diz respeito a um processo de maceração
melhorado com o uso de malte compreendendo o suplemento não
gelatinizado.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

10 Tradicionalmente, a cerveja tem sido preparada apenas do
malte de cevada, lúpulo e água. Entretanto, freqüentemente parte do malte de
cevada é substituída por suplementos tais como o milho, o arroz, o sorgo e o
trigo, amido refinado ou carboidratos facilmente fermentáveis, tais como o
açúcar ou xaropes. Os suplementos são usados principalmente porque eles se
15 acham facilmente disponíveis e fornecem carboidratos a um custo menor do
que aquele que é disponível do malte de cevada. Outras vantagens podem
também ser obtidas, por exemplo a estabilidade física acentuada, as
qualidades superiores à prova do frio, e a maior brilhância.

A maceração é o processo de converter amido do malte de
cevada moído e suplementos em açúcares fermentáveis e não fermentáveis
para produzir mosto da composição desejada. A maceração tradicional
20 envolve misturar malte de cevada moída e suplementos com água em uma
temperatura e volume estabelecidos para prosseguir com as mudanças
bioquímicas iniciadas durante o processo de maltagem. O processo de
maceração é conduzido durante um período de tempo em várias temperaturas,
de modo a ativar as enzimas endógenas responsáveis pela degradação das
25 proteínas e carboidratos. Entretanto, o amido de arroz e de milho, que são
freqüentemente usados como amidos suplementos, têm uma temperatura de
gelatinização mais elevada do que o amido de malte. Portanto, tais
suplementos são cozinhados e gelatinizados em um "fogão de cereais" antes
de serem adicionados ao malte moído. Assim, embora o uso do suplemento

reduza os custos do material bruto, ele requer um investimento adicional n fogão de cereais, bem como um custo adicional de energia para aquecer o suplemento. Um processo de maceração mais simples que permita o uso do cereal suplemento não gelatinizado é assim desejável.

5 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

O inventor da presente invenção surpreendentemente observou que um amido suplemento pode ser adicionado ao malte moído e ser eficientemente macerado sem gelatinização anterior. Assim, um suplemento tal como os cereais de milho, o amido do milho ou o amido do arroz, pode ser
10 macerado com o malte nas temperaturas em que as enzimas de malte endógenas sejam ativas. A liquefação do suplemento não gelatinizado requer que as enzimas de malte endógenas sejam suplementadas por uma composição enzimática exogenamente supridas.

Conseqüentemente, em um primeiro aspecto, a invenção
15 fornece um processo para a produção de um mosto de cervejeiro, compreendendo macerar um cereal contendo malte e um suplemento de amido granular na presença de uma composição enzimática exogenamente fornecida em uma temperatura em que as enzimas de malte endógenas se acham ativas. A invenção ainda fornece um processo para a produção de um
20 mosto de cervejeiro, compreendendo: a) prover um malte moído contendo i) malte, ii) suplemento compreendendo amido granular, e iii) uma composição enzimática exogenamente supridas b) macerar referido malte moído em uma temperatura abaixo da temperatura inicial de gelatinização do referido amido granular, c) separar por maceração em uma temperatura acima da temperatura
25 inicial de gelatinização, e d) separar o grão usado do malte moído e obter um mosto.

Em um segundo aspecto, a invenção provê um mosto produzido pelo processo de acordo com o primeiro e o segundo aspecto.

Em um terceiro aspecto, a invenção provê uma cerveja

produzida pela fermentação do mosto do terceiro aspecto.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

É intenção da presente invenção prover um processo de maceração mais simples, possibilitando o uso de cereal suplemento não gelatinizado no processo.

Definições

Na totalidade deste relatório descritivo, são usados vários termos que são geralmente entendidos por aqueles de experiência normal na técnica. Entretanto, vários termos são usados com significados específicos, e são entendidos como definido pelo seguinte.

Como aqui usado, o termo “**cereal**” é entendido como o material contendo amido ou açúcar, que é a base da produção da cerveja, por exemplo o malte de cevada e o suplemento.

O termo “**malte**” é entendido como qualquer grão de cereal maltado, em particular a cevada.

O termo “**suplemento**” é entendido como a parte do cereal que não seja malte de cevada. O suplemento pode ser qualquer material de plantas rico em amido, tal como, porém sem limitar, o milho, o arroz, o sorgo e o trigo. Suplemento preferido para a invenção é o cereal de milho.

O termo “**malte moído**” é entendido como uma pasta contendo amido compreendendo malte de cevada moído, grão não maltado moído, outro material contendo amido, ou uma combinação destes, permanecendo em água para produzir o mosto.

O termo “**mosto**” é entendido como o escorrimento do líquido não fermentado em seguida à extração do cereal durante a maceração.

A expressão “**grãos usados**” é entendida como os sólidos drenados remanescentes quando o cereal tenha sido extraído e o mosto tenha sido separado.

O termo “**cerveja**” é aqui entendido como um mosto

fermentado, isto é, uma bebida alcoólica preparada de malte de cevada, opcionalmente suplemento e lúpulos.

A expressão “amido granular” é entendida como amido não gelatinizado, ou amido bruto.

5 A expressão “**temperatura inicial de gelatinização**” é entendida como a temperatura mais baixa em que a gelatinização do amido comece. O amido aquecido em água começa a gelatinizar-se entre 50°C e 75°C; a temperatura exata da gelatinização depende do amido específico, e pode facilmente ser determinada pela pessoa habilitada. Assim, a temperatura
10 inicial de gelatinização pode variar de acordo com a espécie da planta, com a variedade particular da espécie de planta, bem como com as condições de cultivo. No contexto desta invenção, a temperatura inicial de gelatinização de um dado amido é a temperatura em que a birrefringência é perdida em 5% dos grânulos de amido com o uso do método descrito por Gorinstein, S. e Lii, C.,
15 *Starch/Starke*, Vol. 44 (12) pp. 461-466 (1992). Quanto ao amido de milho, a temperatura inicial de gelatinização é de aproximadamente 62°C (ponto central: 67°C, conclusão: 72°C), e quanto ao amido de arroz, a temperatura inicial de gelatinização é de aproximadamente 68°C (ponto central: 74,5°C, conclusão: 78°C) (*Starch*, 2ª edição *Industrial microscopy of starch* por
20 Eileen Maywald Snyder).

A expressão “**recuperação do extrato**” no mosto é entendida como a soma das substâncias solúveis do cereal (malte e suplementos) expressa em percentual com base na matéria seca.

25 O termo “**identidade**”, quando usada acerca de seqüências de polipeptídeos ou de DNA e referida neste relatório descritivo, é entendido como o grau de identidade entre duas seqüências, indicando uma derivação da primeira seqüência a partir da segunda. A identidade pode adequadamente ser determinada por meio de programas de computador conhecidos na técnica, tais como o GAP provido no pacote de programas GCG (Manual de

Programas para o Pacote Wisconsin, Versão 8, agosto de 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S. B. e Wunsch, C. D., (1970), *Journal of Molecular Biology*, 48, 443-453). Os seguintes ajustes para comparação das seqüências de polipeptídeo são usados: penalidade de criação do GAP de 3,0 e penalidade de extensão de GAP de 0,1.

Em um primeiro aspecto da invenção, é fornecido um processo para a produção de um mosto de cervejeiro. O processo compreende a maceração de um cereal compreendendo malte e um suplemento de amido granular na presença de uma composição enzimática exogenamente fornecida em uma temperatura em que as enzimas de malte exógenas sejam ativas. A invenção ainda provê um processo para a produção de um mosto de cervejeiro, compreendendo: a) prover um malte moído contendo i) malte, ii) suplemento contendo amido granular, e iii) uma composição enzimática exogenamente fornecida, b) maceração do referido malte moído em uma temperatura abaixo da temperatura inicial de gelatinização do referido amido granular, c) remoção por maceração em uma temperatura acima da temperatura inicial de gelatinização, e d) separar o grão gasto do malte moído e obter um mosto.

De acordo com o primeiro aspecto da presente invenção, um cereal contendo malte e suplemento de amido granular é macerado na presença de uma composição enzimática exogenamente fornecida em uma temperatura em que as enzimas de malte endógenas, por exemplo as alfa-amilases, proteases e beta-amilases, nas quais os processos de maceração tradicionais confiam, são ativas.

A água pode preferivelmente, antes de ser adicionada ao cereal, ser pré-aquecida de modo a que o malte moído alcance a temperatura desejada no momento da sua formação. Se a temperatura do malte moído formado estiver abaixo da temperatura de maceração desejada, calor adicional

preferivelmente é suprido de modo a se obter a temperatura desejada do processo. Preferivelmente, a temperatura de maceração desejada é alcançada dentro dos 15 minutos, ou mais preferível dentro dos 10 minutos, tal como dentro de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 minutos, ou ainda mais preferível dentro de 1 minutos após a formação do malte moído ou, o mais preferível, a temperatura desejada da maceração é alcançada na formação de malte moído. O perfil de temperatura do processo de maceração pode ser um perfil de um processo de maceração convencional em que as temperaturas são ajustadas para se obter degradação ótima da matéria seca do cereal pelas enzimas do malte.

10 O malte é preferivelmente derivado de um ou mais dos grãos selecionados da lista consistindo de milho, cevada, trigo, centeio, sorgo, painço e arroz. Preferivelmente, o malte é malte de cevada.

O cereal preferivelmente compreende de 0,5% a 99%, preferivelmente de 1% a 95%, mais preferível de 5% a 90%, ainda mais preferível de 10% a 80%, e o mais preferível de 50% a 70% de grãos maltados.

Além dos grãos maltados, o cereal pode preferivelmente compreender suplemento tal como o milho não maltado, ou outro grão não maltado, tal como a cevada, o trigo, o centeio, a aveia, o milho, arroz, *milo*, painço e/ou sorgo, ou material contendo amido e/ou açúcar brutos e/ou refinados derivados de plantas como o trigo, cevada, aveia, milho, arroz, *milo*, painço, sorgo, batata, batata doce, mandioca, tapioca, sagu, banana, beterraba e/ou cana de açúcar. Quanto aos suplementos da invenção, podem ser obtidos dos tubérculos, das raízes, dos troncos, das folhas, de legumes, cereais e/ou grãos completos. Preferido é o suplemento obtido do milho e/ou do arroz, mais preferível o suplemento é amido de arroz, amido de corno e/ou cereais de milho. O malte moído preferivelmente compreende de 1% a 50%, preferível de 5% a 45%, mais preferível de 10% a 40%, e ainda mais preferível de 20 a 35% de suplemento de amido. O suplemento contendo

carboidratos facilmente fermentáveis, tais como açúcares ou xaropes, pode ser adicionado ao malte moído antes, durante ou após o processo de maceração da invenção, mas é preferivelmente acrescentado após o processo de maceração.

5 Antes de formar o malte moído, o malte e/ou o suplemento são de preferência moídos e, o mais preferível, moídos secos ou úmidos.

De acordo com a invenção, uma composição enzimática é exogenamente fornecida e pode ser adicionada aos ingredientes do malte moído, por exemplo a água ou o cereal, antes, durante ou após a formação do
10 malte moído. Em uma forma de realização particularmente preferida, a composição enzimática compreende uma alfa-amilase (EC 3.2.1.1) e/ou uma glucoamilase (EC 3.2.1.3). A alfa-amilase é preferivelmente uma alfa-amilase bacteriana e/ou uma alfa-amilase fúngica, por exemplo uma alfa-amilase fúngica ácida. A glucoamilase é preferivelmente uma glucoamilase fúngica.

15 Pela seleção das enzimas que compõem a composição enzimática o perfil de açúcar do mosto resultante pode ser controlado. Uma composição enzimática contendo alfa-amilase, de preferência uma alfa-amilase bacteriana, e pouca ou nenhuma glucoamilase, resultará em um mosto rico em maltose semelhante a um mosto todo de malte. Uma composição
20 enzimática contendo glucoamilase resultará em um mosto rico em glicose.

Em ainda uma forma de realização preferida, uma outra enzima é adicionada, referida enzima sendo selecionada do grupo consistindo de uma celulase, uma pululanase, uma protease, uma maltose gerando enzima, uma lacase, uma lipase, uma fosfolipolase, uma fitase, uma fitina esterase e
25 uma xilanase.

Durante o processo de maceração, o amido extraído do cereal é gradualmente hidrolisado em açúcares fermentáveis e dextrinas menores. De preferência, o malte moído é amido negativo aos testes de iodo, antes de se extrair o mosto.

A maceração é finalizada pela sua remoção em uma temperatura de 70°C ou mais, preferivelmente de pelo menos 71°C, pelo menos 72°C, pelo menos 73°C, pelo menos 74°C, pelo menos 75°C, pelo menos 76°C, pelo menos 77°C, pelo menos 78°C, pelo menos 79°C, pelo menos 80°C e, mais preferível, pelo menos 81°C ou ainda pelo menos 82°C ou mais.

A obtenção do mosto do malte moído tipicamente inclui filtrar o mosto dos grãos gastos, isto é, os grãos insolúveis e a parte formadora do material de folhelhos do cereal. Água quente pode ser escoada através dos grãos gastos para remover por lavagem, ou aspergir, qualquer extrato remanescente do cereal. Preferivelmente a recuperação do extrato é de pelo menos 80%, de preferência 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, e o mais preferível pelo menos 99%, ou mesmo pelo menos 100%. O mosto pode ser usado de qualquer forma, ou pode ser concentrado e/ou secado.

Em uma forma de realização preferida, um cereal compreendendo 60 a 80% de malte de cevada e 20% a 40% de amido de milho e/ou cereais de milho e/ou amido de arroz é macerado na presença de uma alfa-amilase. Preferivelmente, a alfa-amilase AMY1 ou AMY2 descrita abaixo é usada na quantidade de aproximadamente 2 KNU/g de DM, preferivelmente na quantidade de 0,05 a 10 KNU/g de DM, mais preferível 0,1 a 8 KNU/g de DM, ainda mais preferível 0,5 a 5 KNU/g de DM. Preferivelmente, o amido é macerado com o uso de um perfil de temperatura de preferência iniciando-se em aproximadamente 52°C, aumentando-se até aproximadamente 64°C, e desmacerando-se preferivelmente em aproximadamente 78°C ou mais.

Um segundo aspecto da invenção é um mosto produzido pelo método descrito acima. Além do segundo aspecto da invenção, o mosto produzido pelo processo do primeiro aspecto da invenção pode ser

fermentado para produzir uma bebida alcoólica, preferivelmente uma cerveja. A fermentação do mosto pode incluir o lançamento do mosto com uma pasta de levedura compreendendo levedura fresca, isto é, levedura não anteriormente usada para a invenção, ou a levedura pode ser levedura reciclada. A levedura aplicada pode ser qualquer levedura adequada para a
5 preparação de cerveja, especialmente leveduras selecionadas de *Saccharomyces* spp., tal como *S. cerevisiae* e *S. uvarum*, incluindo as variantes destes organismos naturais ou artificialmente produzidas. Os métodos para a fermentação do mosto para a produção de cerveja são bem
10 conhecidos da pessoa habilitada na técnica.

Os processos da invenção podem incluir a adição de hidrogel de sílica ao mosto fermentado para aumentar a estabilidade coloidal da cerveja. Os processos podem ainda incluir adicionar kieselgur ao mosto fermentado e filtrar para tornar a cerveja clara.

15 Um terceiro aspecto da invenção é uma cerveja produzida pelos processos da invenção, uma tal cerveja podendo ser qualquer tipo de cerveja. Tipos preferidos de cerveja compreendem as cervejas inglesas amargas de cor clara, cervejas inglesas fortes, cervejas escuras fortes, cervejas pretas muito fortes, cervejas leves, cervejas amargas, cervejas de exportação,
20 licores de malte, cerveja com baixo teor de malte, cerveja de elevado teor de álcool, cerveja de baixo teor de álcool, cerveja de baixa calorias ou cerveja suave.

ENZIMAS

25 As enzimas exógenas a serem aplicadas na presente invenção devem ser selecionadas quanto à sua capacidade de reter suficiente atividade na temperatura de processo dos processos da invenção, bem como quanto à sua capacidade de reter suficiente atividade sob o regime de pH moderadamente ácido no malte moído, e devem ser adicionadas em quantidades eficazes. As enzimas podem ser derivadas de qualquer fonte,

preferivelmente de uma planta ou de uma alga, e mais preferivelmente de um microorganismo, tal como de uma bactéria ou de um fungo.

Alfa-amilase (EC 3.2.1.1)

Uma enzima alfa-amilase particular a ser usada nos processos da invenção pode ser uma alfa-amilase de *Bacillus*, por exemplo uma alfa-amilase derivada de uma cepa de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. stearothermophilus*. Uma alfa-amilase bacteriana preferida é uma variante de alfa-amilase de *B. stearothermophilus* recombinante com as mutações: I181* + G182* + N193F. A variante é apresentada na SEQ ID NO: 2 (AMY1). Igualmente preferidas são as alfa-amilases tendo uma seqüência de aminoácidos com no mínimo 50%, tal como pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, ou particularmente pelo menos 99% de identidade com a seqüência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 2.

Ainda mais preferida para a invenção é uma alfa-amilase bacteriana compreendendo um módulo de ligação a amido, preferivelmente um módulo de ligação a amido da família 20. Uma tal alfa-amilase pode ser derivada de *Bacillus flavothermus* (sinônimo: *Anoxybacillus contaminans*). A mais preferida é uma alfa-amilase tendo pelo menos 50%, tal como pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, ou em particular pelo menos 99% de identidade com a seqüência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 1 (AMY2).

As alfa-amilases de *Bacillus* podem ser adicionadas nas quantidades de 1,0 a 1000 NU/kg de dm, preferivelmente de 2,0 a 500 NU/kg de dm, preferivelmente 10 a 200 NU/kg de dm.

Outra alfa-amilase particular a ser usada nos processos da invenção pode ser qualquer alfa-amilase fúngica. Particularmente preferidas são as alfa-amilases fúngicas ácidas. Especialmente consideradas são as alfa-amilases fúngicas que apresentam uma alta identidade, isto é, pelo menos

50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85% ou ainda pelo menos 90% de identidade com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 10 na WO 96/23874.

5 As alfa-amilases fúngicas podem ser adicionadas em uma quantidade de 1 a 1000 AFAU/kg de DM, preferivelmente de 2 a 500 AFAU/kg de DM, preferivelmente de 20 a 100 AFAU/kg de DM.

Glucoamilases

10 Uma outra enzima particular a ser usada nos processos da invenção pode ser uma glucoamilase (E.C. 3.2.1.3) derivada de um microorganismo ou de uma planta. Preferidas são as glucoamilases de origem fúngica ou bacteriana selecionadas do grupo consistindo de *Aspergillus glucoamilases*, em particular a glucoamilase de *A. niger* G1 ou G2 [Boel *et al.* (1984), *EMBO J.* 3 (5), pp. 1097-1102), ou suas variantes, tais como
15 apresentadas nas WO 92/00381 e WO 00/04136; a glucoamilase de *A. awamori* (WO 84/02921), *A. oryzae* (*Agric. Biol. Chem.* (1991), 55 (4), pp. 941-949), ou suas variantes ou fragmentos.

Outras variantes de glucoamilase de *Aspergillus* consideradas incluem as variantes para intensificar a estabilidade térmica: G137A e G139A
20 (Chen *et al.* (1996), *Prot. Engng.* 9, 499-505); D257E e D293E/Q (Chen *et al.* (1995), *Prot. Engng.* 8, 575-582); N182 (Chen *et al.* (1994), *Biochem. J.* 301, 275-281); ligações dissulfeto, A246C (Fierobe *et al.* (1996), *Biochemistry*, 35, 8698-8704; e a introdução dos resíduos Pro nas posições A435 e S436 (Li *et al.* (1997), *Protein Engng.* 10, 1199-1204). Outras glucoamilases
25 consideradas incluem as glucoamilases de *Talaromyces*, em particular derivadas de *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448), *Talaromyces leycettanus* (Patente U.S. nº Re. 32.153), *Talaromyces duponti*, *Talaromyces thermophilus* (U.S. 4.587.215). As glucoamilases bacterianas consideradas incluem glucoamilases do gênero *Clostridium*, em particular *C.*

thermoamylolyticum (EP 135.138) e *C. thermohydrosulfuricum* (WO 86/01831). Glucoamilases preferidas incluem as glucoamilases derivadas de *Aspergillus oryzae*, tal como uma glucoamilase tendo pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou particularmente pelo menos 99%, ainda pelo menos 90% de identidade com a seqüência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 2 na WO 00/04136. Igualmente considerados são os produtos comerciais AMG 200L, AMG 300 L, SAN[®] SUPER e AMG[®] E (da Novozymes); OPTIDEX[®] 300 (da Genencor Int.); AMIGASE[®] e AMIGASE[®] PLUS (da DSM); G-ZYME[®] G900 (da Enzyme Bio-Systems); G-ZYME[®] G990 ZR (Glucoamilase de *A. niger* baixo teor de protease). As glucoamilases podem ser adicionadas nas quantidades eficazes bem conhecidas da pessoa habilitada na técnica.

Celulase (E.C. 3.2.1.4)

A celulase pode ser de origem microbiana, tal como derivável de uma cepa de um fungo filamentoso (por exemplo, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Fusarium*). Exemplos específicos de celulases incluem a endoglucanase (endoglucanase I) obténível de *H. insolens* e ainda definida pela seqüência de aminoácidos da Figura 14 na WO 91/17244 e a endoglucanase de *H. insolens* de 43 kD descrita na WO 91/17243.

Uma celulase particular a ser usada nos processos da invenção pode ser uma endoglucanase, tal como uma endo-1,4-beta-glucanase. Consideradas são as beta-glucanases tendo pelo menos 90% de identidade com a seqüência de aminoácidos apresentada como SEQ ID NO: 1 na WO 2003/062409, tal como pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou, particularmente, pelo menos 99%.

Preparações de celulase comercialmente disponíveis que podem ser usadas incluem a CELLU-CLAST[®], CELLUZYME[®], CEREFLO[®] e ULTRAFLO[®] (disponíveis da Novozymes A/S), LAMINEX[®] e SPEZYME[®] CP (disponível da Genencor Int.) e ROHAMENT[®] 7069 W

(disponível da Rohm, Alemanha).

As beta-glucanases podem ser adicionadas nas quantidades de 1,0 a 10000 BGU/kg de dm, preferivelmente de 10 a 5000 BGU/kg de dm, preferivelmente de 50 a 1000 BGU/kg de dm, e o mais preferível de 100 a 500 BGU/kg de dm.

Enzimas des-ramificadoras

Outra enzima aplicada no processo da invenção pode ser uma enzima des-ramificadora, tal como uma isoamilase (E.C. 3.2.1.68) ou uma pululanase (E.C. 3.2.1.41). A isoamilase hidrolisa as articulações dos ramos alfa-1,6-D-glucosídicos na amilopectina e nas dextrinas de limite beta, e pode ser distinguida das pululanases pela incapacidade da isoamilase de atacar o pululano, e pela ação limitada sobre as dextrinas de limite alfa. A enzima des-ramificadora pode ser adicionada em quantidades eficazes bem conhecidas da pessoa habilitada na técnica.

Protease

As proteases adequadas incluem as proteases microbianas, tais como as proteases fúngicas e as bacterianas. Proteases preferidas são as proteases acídicas, isto é, as proteases caracterizadas pela capacidade de hidrolisar proteínas sob condições acídicas abaixo de pH 7.

Proteases fúngicas ácidas consideradas incluem as proteases fúngicas derivadas de *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Candida*, *Coriolus*, *Endothia*, *Enthomophtra*, *Irpex*, *Penicillium*, *Sclerotium* and *Torulopsis*. Especialmente consideradas são as proteases derivadas de *Aspergillus niger* (ver, por exemplo, Koaze *et al.*, (1964), *Agr. Biol. Chem. Japan*, 28, 216), *Aspergillus saitoi* (ver, por exemplo, Yoshida, (1954) *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 28, 66), *Aspergillus awamori* (Hayashida *et al.*, (1977) *Agric. Biol. Chem.*, 42(5), 927-933, *Aspergillus aculeatus* (WO 95/02044) ou *Aspergillus oryzae*, tal como a protease pepA; e as proteases acídicas de *Mucor pusillus* ou *Mucor miehei*.

São também consideradas as proteases neutras e as alcalinas, tais como uma protease derivada de uma cepa de *Bacillus*. Uma protease particular considerada pela invenção é derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* e tem a sequência obtível em Swissprot com o número de Acesso P06832 bem como proteases tendo pelo menos 90% de identidade com a referida sequência de aminoácidos, tal como pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou particularmente pelo menos 99%.

São ainda consideradas as proteases tendo pelo menos 90% de identidade com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 1 nos pedidos de patentes dinamarqueses PA 2001 01821 e PA 2002 00005, tal como pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou particularmente pelo menos 99%.

São também consideradas as proteases semelhantes à papaína, tais como as proteases dentro da E.C. 3.4.22.* (cisteína protease), tais como as EC 3.4.22.15 (catepsina L), EC 3.4.22.25 (glicil endopeptidase) e EC 3.4.22.30 (caricaína).

As proteases são responsáveis pela redução do comprimento total das proteínas de elevado peso molecular para as proteínas de baixo peso molecular no malte moído. As proteínas de baixo peso molecular são uma necessidade para a nutrição de levedura, e as proteínas de elevado peso molecular garantem a estabilidade da espuma. Assim sendo, é bem conhecido da pessoa habilitada que a protease deve ser adicionada em uma quantidade equilibrada que, ao mesmo tempo, considere aminoácidos livres *amle* para a levedura e possibilite suficientes proteínas de alto peso molecular para estabilizar a espuma. As proteases podem ser adicionadas nas quantidades de 0,1 a 1000 AU/kg de dm, preferivelmente 1 a 100 AU/kg de dm, e o mais preferível 5 a 25 AU/kg de dm.

MATERIAIS E MÉTODOS

Enzimas

AMY1: Uma variante de alfa-amilase de *B. stearothermophilus* tendo a seqüência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4 na WO 99/19467, com as mutações: 1181* + G182* + N193F.

AMY2: Uma alfa-amilase de *Anoxybacillus contaminans* tendo a seqüência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 1.

Métodos

Atividade Proteolítica (AU)

A atividade proteolítica pode ser determinada com hemoglobina desnaturada como substrato. No método Anson-Hemoglobina para a determinação da atividade proteolítica, a hemoglobina desnaturada é digerida, e a hemoglobina não digerida é precipitada com ácido ticloroacético (TCA). A quantidade do produto solúvel de TCA é determinada com reagente de fenol, o qual dá uma cor azul com tirosina e triptofano.

Uma Unidade Anson (AU) é definida como a quantidade de enzima que, sob condições padrão (isto é, 25°C, pH 7,5, e tempo de reação de 10 minutos), digere a hemoglobina em uma velocidade inicial tal que é liberada por minuto uma quantidade do produto solúvel de TCA que dá a mesma cor com o reagente de fenol como um miliequivalente de tirosina.

Uma pasta AF 4/5 descrevendo o método analítico em mais detalhes, acha-se disponível sob solicitação à Novo Nordisk A/S, Dinamarca, pasta esta que fica aqui incluída como referência.

Atividade da alfa-amilase (NU)

A atividade amilolítica pode ser determinada com o uso de amido de batata como substrato. Este método baseia-se na decomposição do amido de batata modificado pela enzima, e a reação é seguida pela mistura de amostras da solução de amido/enzima com uma solução de iodo. Inicialmente, uma cor azul enegrecida é formada, mas durante a decomposição do amido, a cor azul se torna mais fraca e gradualmente se torna um marrom avermelhado, o que é comparado com um padrão de vidro colorido.

Uma Unidade de Kilo Novo (KNU) de alfa-amilase é igual a 1000 NU. Uma KNU é definida como a quantidade de enzima que, sob condições padrão (isto é, em $37^{\circ}\text{C} \pm 0,05$; Ca^{2+} 0,0003 M; e pH 5,6) destriniza 5,26 g de substância seca de amido Merck Amylum solúvel.

5 Uma pasta AF 9/6 descrevendo este método analítico em mais detalhes, acha-se disponível sob solicitação à Novozymes A/S, Dinamarca, pasta esta que fica aqui incluída como referência.

Atividade da glucoamilase (AGU)

10 A Unidade Novo Glucoamilase (AGU) é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 micromol de maltose por minuto em 37°C e pH 4,3.

A atividade é determinada como AGU/ml por um medido modificado após (AEL-SM-0131, disponível sob solicitação à Novozymes) o uso do kit Glucose God-Perid da Boehringer Mannheim, 124036, Standard: 15 padrão AMG, lote 7-1195, 195 AGU/ml. 375 microlitros de substrato (1% de maltose em acetato de sódio 50 mM, pH 4,3) são incubados por 5 minutos em 37°C . 25 microlitros de enzima diluída em acetato de sódio são adicionados. A reação é interrompida após 10 minutos pela adição de 100 microlitros de NaOH 0,25 M. 20 microlitros são transferidos para uma placa microtituladora 20 de 96 reservatórios e 200 microlitros da solução GOD-Perid (124036, Boehringer Mannheim) são acrescentados. Após 30 minutos na temperatura ambiente, a absorbância é medida em 650 nm e a atividade é calculada em AGU/ml do padrão AMG. Uma descrição detalhada do método analítico (AEL-SM-0131) acha-se disponível mediante solicitação da Novozymes.

25 Atividade da beta-glucanase (BGU)

A atividade celulítica pode ser medida em unidades de beta-glucanase (BGU). A beta-glucanase reage com beta-glucano para formar glicose ou carboidrato redutor, o que é determinado como açúcar redutor com o uso do método de Somogyi-Nelson. 1 unidade de beta-glucanase (BGU) é a

quantidade de enzima que, sob condições padrão, libera glicose ou carboidrato redutor com uma capacidade de redução equivalente a 1 μmol de glicose por minuto. As condições padrão são 0,5% de beta-glucano como substrato em pH 7,5 e 30°C, para um tempo de redução de 30 minutos. Uma
 5 descrição detalhada do método analítico (EB-SM-0070.02/01) acha-se disponível mediante solicitação da Novozymes A/S.

Processo de maceração Congress padrão

O processo de maceração Congress padrão foi realizado de acordo com o procedimento do EBC 4.5.1 Extract of Malt: Congress Mash. O
 10 perfil de temperatura consistiu da temperatura de maceração inicial de 45°C por 30 minutos, aumentando-se para 70°C com 1,0°C/minuto durante 25 minutos, finalizada por 70°C durante 65 minutos, dando um período total de maceração de 2 horas.

Métodos adicionais

15 Métodos para análise dos produtos brutos, do mosto, da cerveja etc. podem ser encontrados em Analytica-EBC, Analysis Committee of EBC, European Brewing Convention (1998), Verlag Hans Carl Geranke-Fachverlag. Para a presente invenção, os métodos aplicados para determinação dos seguintes parâmetros foram:

20 Plato: refratômetro.

Assimilável N: Com base no EBC: 8,10, mas com TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico) como reagente, ao invés da ninidrina. O TNBS reage em uma solução de grupos amino livres ou aminoácidos e peptídeos, o que cria um
 25 complexo amarelo, o qual é medido mediante espectrofotometria em 340 nm.

Beta-glucano: EBC: 8.13.2 (teor de beta-glucano de alto peso molecular do mosto: Método Fluorométrico).

Cor: EBC: 4.7.2

	Modificação:	EBC: 4.14 Modificação e Homogeneidade do malte, método Calcoflour.
5	Filtrabilidade:	Determinação do volume do filtrado (ml): De acordo com EBC: 4.5.1 (Extrato de Malte: Congress Mash) subseção 8.2. Filtração: O volume da filtração é lido após 1 hora de filtração através de papel de filtro estriado, diâmetro 320 mm, Schleicher e Schüll nº 597 ½, Machery, Nagel and Co. em funis, diâmetro de 200 mm, ajustados em frascos de 500 ml.
	pH:	EBC: 8.17 (pH do Mosto).
10	Índice Kolbach	EBC: 4.9.1 (Nitrogênio de Malte Solúvel: Método Espectrofotométrico) e EBC: 3.3.1 [Nitrogênio Total da Cevada: Método Kjeldahl (RM)].
15	Recuperação do Extrato	EBC: 4.5.1 (Extrato de Malte: Congress Mash, Extrato a seco, rendimento). A expressão recuperação do extrato no mosto é definida como a soma das substâncias solúveis (glicose, sacarose, maltose, maltotriose, dextrinas, proteína, gomas, outras substâncias inorgânicas) extraídas do cereal (malte e suplementos) expressas em percentuais com base na matéria seca. A parte insolúvel remanescente
20		é definida como grãos gastos.

$$a) E_1 = \frac{P(M + 800)}{100 - P}$$

$$b) E_2 = \frac{E_1 \cdot 100}{100 - M}$$

em que:

E_1 = teor de extrato da amostra, em% (m/m)

E_2 = teor de extrato do cereal seco, em% (m/m)

P = teor de extrato no mosto, em% de Platô

25 M = teor da umidade do cereal, em% (m/m)

800 = quantidade de água destilada acrescentada à malte

moído até 100 g de cereal.

Preparação do malte moído

A menos que de outra forma estabelecido, a maceração foi realizada como segue: O malte moído foi preparado de acordo com EBC: 4.5.1 com o uso de malte triturado de acordo com EBC: 1.1. As provas da maceração foram realizadas em vasos tampados de 500 ml, cada um contendo um malte moído com 50 g de cereal e ajustado a um peso total de $250 \pm 0,2$ g com água pré-aquecida até uma temperatura inicial da maceração de $+ 1^{\circ}\text{C}$. Durante a maceração, os vasos foram incubados em banho de água com agitação. Após a maceração e antes da filtração, foi acrescentada água a cada vaso até um total de 300 g. Após a filtração, o mosto foi fervido por 10 minutos e diluído com água a 1:1. Para porções de 200 g de mosto foi adicionado 1,2 g de levedura e a fermentação foi realizada por 4 dias.

Exemplos

Exemplo 1

Um cereal compreendendo 65% de malte bem modificado e 35% de amido de milho, foi macerado na presença de uma alfa-amilase com o uso do perfil de temperatura de maceração consistindo de 34 minutos em 52°C , aumento de $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ durante 18 minutos, 60°C durante 60 minutos, aumento de $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ durante 18 minutos, 78°C durante 20 minutos, seguido por resfriamento até 20°C . O mosto e a cerveja nova foram analisados por HPLC. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Amido de milho: perfil de açúcar, Plato e rendimento de mosto diluído, álcool, da cerveja nova

Dosagem de enzima KNU/g DM		DP1 g/l	DP2 g/l	DP3 g/l	Açúcar ferment. g/l	DP3+ g/l	Plato	Rend, %	Álcool p/p
-	0,00	9,91	26,39	11,57	47,87	28,70	7,47	88,85	2,17
AMY1	0,50	10,21	29,34	15,26	53,81	25,99	7,79	93,29	2,44
AMY1	0,75	10,05	28,83	14,29	53,17	24,21	7,57	90,30	2,46
AMY1	1,00	10,26	29,31	14,72	54,28	23,55	7,60	90,68	2,51
AMY1	1,50	10,65	30,26	15,39	56,29	22,82	7,72	92,31	2,59
AMY1	2,00	10,71	30,33	15,74	56,78	22,00	7,71	92,28	2,61
AMY2	0,50	9,72	35,42	15,94	61,08	21,40	8,02	96,65	2,79
AMY2	0,75	9,21	35,32	15,82	60,35	18,56	7,72	92,38	2,78
AMY2	1,00	8,97	34,51	15,74	59,22	17,33	7,49	89,16	2,61
AMY2	1,50	9,14	36,11	16,76	62,01	16,66	7,70	92,10	2,85
AMY2	2,00	9,31	37,53	17,45	64,29	15,81	7,86	94,30	2,96

Exemplo 2

Um cereal compreendendo 65% de malte bem modificado e 35% de amido de arroz, foi macerado na presença de uma alfa-amilase com o uso do perfil de temperatura de maceração consistindo de 34 minutos em 52°C, aumento de 1°C/minuto durante 18 minutos, 64°C durante 60 minutos, aumento de 1°C/minuto durante 18 minutos, 78°C durante 20 minutos, seguido por resfriamento até 20°C. O mosto e a cerveja nova foram analisados por HPLC. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Amido de arroz: perfil de açúcar, Plato e rendimento de mosto diluído, álcool, da cerveja nova

Dosagem de enzima KNU g/DM	DP1 g/l	DP2 g/l	DP3 g/l	Açúcar ferment. g/l	DP3+ g/l	Plato	Rend. %	Álcool P/p	RDF	RDF	
-	0,00	15,50	28,41	13,41	57,32	14,63	7,25	86,11	2,57	82,8	67,2
AMY1	0,50	14,70	26,99	13,79	55,48	12,87	7,52	89,87	2,70	83,9	68,1
AMY1	0,75	15,37	28,25	14,60	58,22	12,79	7,22	85,77	2,54	84,4	68,6
AMY1	1,00	14,33	26,65	13,94	54,93	11,69	7,31	86,94	2,56	84,9	68,9
AMY1	1,50	14,32	26,33	13,99	54,64	11,08	7,32	87,14	2,56	85,2	69,2
AMY1	2,00	14,46	26,39	14,34	55,18	11,22	7,41	88,38	2,60	85,4	69,4
AMY2	0,50	14,23	28,36	14,61	57,20	11,01	7,61	91,22	2,70	86,1	69,9
AMY2	0,75	14,41	28,69	15,05	58,15	10,55	7,49	89,52	2,62	86,2	70,0
AMY2	1,00	14,16	28,67	15,13	57,96	9,94	7,34	87,38	2,60	87,0	70,6
AMY2	1,50	14,53	29,60	15,78	59,91	9,53	7,72	92,72	2,76	88,1	71,5
AMY2	2,00	14,76	29,77	16,12	60,65	9,51	7,55	90,32	2,70	87,3	70,8

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

```

<110>  Novozymes A/S
<120>  10934 LTM
<130>  10934.000-DK
<160>  2
<170>  PatentIn versão 3.3
<210>  1
<211>  619
<212>  PRT
<213>  Anoxybacillus contaminans
<220>
<221>  SINAL
<222>  (1)..(31)
<220>
<221>  mat_peptideo
<222>  (32)..(619)
<400>  1
Met Ser Leu Phe Lys Lys Ser Phe Pro Trp Ile Leu Ser Leu Leu Leu
-30          -25          -20
Leu Phe Ser Phe Ile Ala Pro Phe Ser Ile Gln Thr Glu Lys Val Arg
-15          -10          -5          -1  1
Ala Gly Ser Val Pro Val Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp
      5          10          15
Tyr Leu Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Asn Ala
      20          25          30
Gln Ser Leu Ala Asn Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala
      35          40          45
Tyr Lys Gly Thr Ser Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu
50          55          60          65
Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr
      70          75          80
Gly Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Thr Ala
      85          90          95
Gly Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala
      100          105          110
Asp Gly Thr Glu Leu Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg
      115          120          125
Asn Gln Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe
130          135          140          145
Asp Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp
      150          155          160
Tyr His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg
      165          170          175
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp
      180          185          190
Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met
      195          200          205
Asp His Pro Glu Val Val Ser Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr
210          215          220          225
Val Thr Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His
      230          235          240
Ile Lys Tyr Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Thr Gln
      245          250          255
Thr Gln Lys Pro Leu Phe Ala Val Gly Glu Phe Trp Ser Tyr Asp Ile
      260          265          270
Ser Lys Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Ser Met Ser Leu
      275          280          285
Phe Asp Ala Pro Leu His Asn Asn Phe Tyr Ile Ala Ser Lys Ser Gly
290          295          300          305
Gly Tyr Phe Asp Met Arg Thr Leu Leu Asn Asn Thr Leu Met Lys Asp
      310          315          320

```

Gln Pro Thr Leu Ala Val Thr Leu Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro
 325 330 335
 Gly Gln Ser Leu Gln Ser Trp Val Glu Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala
 340 345 350
 Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr
 355 360 365
 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Lys Tyr Asn Ile Pro Ala Leu Lys Ser
 370 375 380 385
 Lys Leu Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr
 390 395 400
 Gln His Asp Tyr Ile Asp Ser Ala Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu
 405 410 415
 Gly Val Ala Glu Lys Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp
 420 425 430
 Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly
 435 440 445
 Lys Thr Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile
 450 455 460 465
 Asn Ala Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser
 470 475 480
 Ile Trp Val Pro Lys Ile Ser Thr Thr Ser Gln Ile Thr Phe Thr Val
 485 490 495
 Asn Asn Ala Thr Thr Val Trp Gly Gln Asn Val Tyr Val Val Gly Asn
 500 505 510
 Ile Ser Gln Leu Gly Asn Trp Asp Pro Val His Ala Val Gln Met Thr
 515 520 525
 Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Trp Thr Val Thr Ile Pro Leu Leu Gln Gly
 530 535 540 545
 Gln Asn Ile Gln Phe Lys Phe Ile Lys Lys Asp Ser Ala Gly Asn Val
 550 555 560
 Ile Trp Glu Asp Ile Ser Asn Arg Thr Tyr Thr Val Pro Thr Ala Ala
 565 570 575
 Ser Gly Ala Tyr Thr Ala Ser Trp Asn Val Pro
 580 585
 <210> 2
 <211> 513
 <212> PRT
 <213> Bacillus stearothermophilus
 <400> 2
 Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu
 1 5 10 15
 Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn
 20 25 30
 Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys
 35 40 45
 Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp
 50 55 60
 Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr
 65 70 75 80
 Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met
 85 90 95
 Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly
 100 105 110
 Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn Gln
 115 120 125
 Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe
 130 135 140
 Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His
 145 150 155 160
 Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr
 165 170 175
 Lys Phe Arg Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu Phe Gly
 180 185 190

Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His Pro Glu
 195 200 205
 Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn Thr Thr
 210 215 220
 Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser
 225 230 235 240
 Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Ser Gln Thr Gly Lys Pro
 245 250 255
 Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys Leu His
 260 265 270
 Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asp Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp Ala Pro
 275 280 285
 Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Ala Phe Asp
 290 295 300
 Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro Thr Leu
 305 310 315 320
 Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln Ala Leu
 325 330 335
 Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile
 340 345 350
 Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr
 355 360 365
 Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile Asp Pro
 370 375 380
 Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr
 385 390 395 400
 Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Gly Thr Glu
 405 410 415
 Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly
 420 425 430
 Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val Phe Tyr
 435 440 445
 Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser Asp Gly
 450 455 460
 Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp Val Pro
 465 470 475 480
 Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Arg Pro Ile Thr Thr Arg Pro
 485 490 495
 Trp Thr Gly Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val Ala Trp
 500 505 510
 Pro

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a produção de um mosto de cervejeiro, caracterizado pelo fato de que compreende a maceração de um cereal contendo malte e um suplemento de amido granular na presença de uma
5 composição enzimática exogenamente fornecida, em uma temperatura na qual as enzimas de malte endógenas ficam ativas.

2. Processo para a produção de um mosto de cervejeiro, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) fornecer um malte moído contendo:

10

i) malte,

ii) suplemento contendo amido granular, e

iii) uma composição enzimática exogenamente fornecida,

b) macerar referido malte moído em uma temperatura abaixo da temperatura inicial de gelatinização do referido amido granular,

15

c) desmacerar, em uma temperatura acima da temperatura inicial de gelatinização; e

d) separar os grãos gastos do malte moído e obter um mosto.

3. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que os grãos maltados no malte são
20 selecionados da lista consistindo de milho, cevada, trigo, centeio, sorgo, painço e arroz.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o suplemento compreende pelo menos um grão não maltado.

25

5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o suplemento compreende grãos selecionados dentre milho, cevada, trigo, centeio, sorgo, painço e arroz.

6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o suplemento compreende amido

derivado de milho, arroz, cevada, trigo, centeio, sorgo, painço, mandioca, sagu.

7. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o suplemento compreende cereais de milho ou amido de milho, preferivelmente amido de milho de um processo de moagem a úmido.

8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o cereal do malte moído compreende de 1% a 100%, preferivelmente de 5% a 90%, mais preferível de 10% a 80%, e ainda mais preferível de 50 a 70% de grãos maltados.

9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o cereal do malte moído compreende de 1% a 50%, preferivelmente de 5% a 45%, mais preferível de 10% a 40%, e ainda mais preferível de 20 a 35% de amido do suplemento.

10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o rendimento do extrato do malte moído é de pelo menos 88%, preferivelmente pelo menos 89%, mais preferível pelo menos 90%, e o mais preferível pelo menos 91%.

11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a composição enzimática exogenamente fornecida compreende uma glucoamilase e/ou uma alfa-amilase.

12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a composição enzimática exogenamente fornecida ainda compreende uma celulase, uma pululanase e/ou uma protease.

13. Processo de acordo com as reivindicações 11 ou 12, caracterizado pelo fato de que a alfa-amilase é uma alfa-amilase bacteriana.

14. Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a alfa-amilase é uma alfa-amilase bacteriana compreendendo

um módulo de ligação de amido.

15. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 14, caracterizado pelo fato de que a alfa-amilase é um polipeptídeo tendo pelo menos 50% de identidade com a seqüência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 1.

16. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 14, caracterizado pelo fato de que a alfa-amilase é um polipeptídeo tendo pelo menos 50% de identidade com qualquer seqüência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 2.

17. Processo de acordo com as reivindicações 11 ou 12, caracterizado pelo fato de que a glucoamilase é derivada de *Aspergillus niger*.

18. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que ainda compreende concentrar e/ou secar o mosto.

19. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que ainda compreende fermentar o mosto para se obter uma bebida alcoólica.

20. Processo de acordo com a reivindicação precedente, caracterizado pelo fato de que a bebida alcoólica é uma cerveja.

21. Processo de acordo com as reivindicações 19 ou 20, caracterizado pelo fato de que a cerveja é cerveja inglesa amarga de cor clara, cerveja inglesa forte, cerveja amarga, cerveja escura forte, cerveja preta muito forte, cerveja leve, cerveja de exportação, licor de malte, vinho de cevada, cerveja com baixo teor de malte, cerveja de elevado teor de álcool, cerveja de baixo teor de álcool, cerveja de baixa calorias ou cerveja suave.

22. Mosto, caracterizado pelo fato de ser produzido pelo processo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 18.

23. Cerveja, caracterizada pelo fato de ser produzida pelo processo como definido em qualquer uma das reivindicações 19 a 21.

RESUMO

“PROCESSOS PARA A PRODUÇÃO DE UM MOSTO DE CERVEJEIRO
E PARA A PRODUÇÃO DE CERVEJA”

5 A presente invenção fornece processos para a produção de
mosto e cerveja de um cereal suplemento de amido granular macerado em
uma temperatura abaixo da temperatura de gelatinização do referido amido.