

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 027 937**

51 Int. Cl.:

**C12C 12/02** (2006.01)

**C12C 12/00** (2006.01)

**C12C 5/00** (2006.01)

**C12C 3/00** (2006.01)

**A23L 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2018 PCT/US2018/051733**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2019 WO19067287**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2018 E 18786111 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2025 EP 3673039**

54 Título: **Producción de mosto de cerveza que tiene un incremento de azúcares fermentables**

30 Prioridad:

**29.09.2017 US 201762565210 P**

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

**17.06.2025**

73 Titular/es:

**INTERNATIONAL N&H DENMARK APS (100.00%)  
Parallelvej 16  
2800 Kongens Lyngby, DK**

72 Inventor/es:

**CRAMER, JACOB FLYVHOLM y  
BLADT, TOVE**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

Observaciones:

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

ES 3 027 937 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

Producción de mosto de cerveza que tiene un incremento de azúcares fermentables

## 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En la producción de cerveza, durante la etapa de maceración, se generan azúcares fermentables a partir de almidón que posteriormente se convierten en etanol por medio de levadura. Sin embargo, no todo el almidón se convierte en azúcares fermentables. Después de la maceración, permanecen oligómeros de glucosa cortos, que no pueden ser convertidos en etanol por la levadura de cerveza. Estos oligómeros, también llamados dextrinas, son habitualmente 4 y más unidades glucídicas (DP4+). Después de la purificación del macerado, el mosto contiene típicamente alrededor de 65 a 80% de azúcar fermentable y de 20 a 35% de dextrina soluble que no es fermentable, es decir, no se convertirá en etanol. La presencia de azúcares no fermentables en una cerveza hace que la cerveza tenga más calorías que una cerveza fermentada a partir de un mosto que tenga más azúcares fermentables.

15 Sigue existiendo una necesidad en la técnica de métodos para producir mostos que tengan menos azúcares no fermentables y más azúcares fermentables para producir cervezas con un contenido calórico inferior.

20 El documento WO2016/100871 divulga métodos para sacarificar un sustrato de almidón con una glucoamilasa que consiste o que comprende la secuencia de aminoácidos de glucoamilasa de *Fusarium verticillioides* (Fv-GA) y además poner en contacto el sustrato de almidón con al menos una glucoamilasa adicional.

## SUMARIO DE LA INVENCION

25 La presente invención proporciona un método para producir un mosto de cerveza que tiene un incremento de azúcar de DP1 que comprende añadir a un macerado que comprende una sémola una primera glucoamilasa, una segunda glucoamilasa y una tercera glucoamilasa, donde la primera glucoamilasa no es igual que la segunda glucoamilasa, para producir el mosto de cerveza, donde dicha tercera glucoamilasa es diferente de dicha primera glucoamilasa y dicha segunda glucoamilasa, donde dicha primera glucoamilasa es una glucoamilasa de *Fusarium venenatum* como la indicada en SEQ ID NO: 1 (FvGA) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma, dicha segunda glucoamilasa es una glucoamilasa de *Aspergillus fumigatus* como la indicada en SEQ ID NO: 2 (AfuGA) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma, y dicha tercera glucoamilasa es una glucoamilasa de variante de *Trichoderma reesei* como la indicada en SEQ ID NO: 4 (TrGA\_var1) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma y donde la primera y la segunda glucoamilasas proceden de diferentes hongos filamentosos.

40 El sumario de la invención se continúa listando un número de aspectos y opciones, todos los cuales solo son parte de la invención reivindicada en la medida en que se encuentren dentro del alcance del método para producir un mosto de cerveza indicado anteriormente en el presente documento.

Todos los otros aspectos, opciones y selecciones se han de interpretar como comparativos para la invención reivindicada.

45 En un aspecto de la presente descripción, se presenta un método para producir un mosto de cerveza que tiene un incremento de azúcar de DP1 que tiene la etapa de añadir a un macerado que tiene una sémola una primera glucoamilasa y una segunda glucoamilasa, donde la primera glucoamilasa no es la misma que la segunda glucoamilasa, para producir el mosto de cerveza.

50 Opcionalmente, el hongo filamentosos se selecciona del grupo que consiste en *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Holomastigotoides*, *Humicola*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptosphaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromyces*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotrichonympha*, *Rhizomucor*, *Schizophyllum*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella* y *Xylaria*.

Opcionalmente, la primera y la segunda glucoamilasas proceden de diferentes hongos filamentosos.

60 Opcionalmente, el hongo filamentosos se selecciona del grupo que consiste en *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bacridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium*

### ES 3 027 937 T3

- sambucinum, *Fusarium sarcochrom*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Penicillium thomii*, *Penicillium oxalicum*, *Thielavia achromatica*,  
5 *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia spededonium*, *Thielavia setosa*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.
- 10 Opcionalmente, el hongo filamentoso se selecciona del grupo que consiste en *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium venenatum* y *Trichoderma reesei*.
- Opcionalmente, la primera y/o dicha segunda glucoamilasas son variantes de una glucoamilasa de *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium venenatum* y *Trichoderma reesei*.
- 15 Opcionalmente, la primera y la segunda glucoamilasa tienen 60% o menos de identidad de secuencia.
- Opcionalmente, la primera y la segunda glucoamilasa tienen 58% o menos de identidad de secuencia.
- 20 Opcionalmente, la primera y la segunda glucoamilasa tienen 56% o menos de identidad de secuencia.
- Opcionalmente, la primera y la segunda glucoamilasa tienen 54% o menos de identidad de secuencia.
- Opcionalmente, la primera y la segunda glucoamilasa tienen 52% o menos de identidad de secuencia.
- 25 Opcionalmente, la primera y dicha glucoamilasa tienen 50% o menos de identidad de secuencia.
- Opcionalmente, la primera y la segunda glucoamilasas se seleccionan del grupo que consiste en una glucoamilasa de *Fusarium venenatum* como la indicada en SEQ ID NO: 1 (FvGA) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma, una glucoamilasa de *Aspergillus fumigatus* como la indicada en SEQ ID NO: 2 (AfuGA) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma, una glucoamilasa de *Trichoderma reesei* como la indicada en SEQ ID NO: 3 (TrGA) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma, una primera glucoamilasa variante de *Trichoderma reesei* como la indicada en SEQ ID NO: 4 (TrGA\_var1) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma y una segunda glucoamilasa variante de *Trichoderma reesei* como la indicada en SEQ ID NO: 5 TrGA\_var2 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma.
- 30 Opcionalmente, la primera y la segunda glucoamilasas se seleccionan del grupo que consiste en FvGA como la indicada en SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con la misma, AfuGA como la indicada en SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con la misma, TrGA como la indicada en SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con la misma, TrGA\_var1 como la indicada en SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con la misma y TrGA\_var2 como la indicada en SEQ ID NO: 5 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con la misma.
- 40 Opcionalmente, la primera y la segunda glucoamilasas se seleccionan del grupo que consiste en FvGA como la indicada en SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con la misma, AfuGA como la indicada en SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con la misma, TrGA como la indicada en SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con la misma, TrGA\_var1 como la indicada en SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con la misma y TrGA\_var2 como la indicada en SEQ ID NO: 5 o una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con la misma.
- 45 Opcionalmente, la primera y la segunda glucoamilasas se seleccionan del grupo que consiste en FvGA como la indicada en SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene al menos 99% de identidad con la misma, AfuGA como la indicada en SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene al menos 99% de identidad con la misma, TrGA como la indicada en SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene al menos 99% de identidad con la misma, TrGA\_var1 como la indicada en SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene al menos 99% de identidad con la misma y TrGA\_var2 como la indicada en SEQ ID NO: 5 o una secuencia que tiene al menos 99% de identidad con la misma.
- 50 Opcionalmente, la primera y la segunda glucoamilasas se seleccionan del grupo que consiste en FvGA como la indicada en SEQ ID NO: 1, AfuGA como la indicada en SEQ ID NO: 2, TrGA como la indicada en SEQ ID NO: 3, TrGA\_var1 como la indicada en SEQ ID NO: 4 y TrGA\_var2 como la indicada en SEQ ID NO: 5.
- 55 Opcionalmente, la primera y dicha segunda glucoamilasas son distintas de TrGA y TrGA\_var1, TrGA\_var1 y TrGA\_var2 o TrGA y TrGA\_var2.
- 60 Opcionalmente, la primera y dicha segunda glucoamilasas comprenden TrGA y FvGA, AfuGA y FvGA, TrGA y
- 65

AFuGA o TrGA\_var2 y FvGA.

Opcionalmente, la primera y dicha segunda glucoamilasas son TrGA y FvGA, AFuGA y FvGA, TrGA y AFuGA o TrGA\_var2 y FvGA.

5

Opcionalmente, la primera y la segunda glucoamilasas tienen una proporción predeterminada.

Opcionalmente, la primera y la segunda glucoamilasas son TrGA y FvGA que tienen una proporción en masa de alrededor de 3:2 o más. Opcionalmente, la proporción en masa es alrededor de 4:1.

10

Opcionalmente, la primera y la segunda glucoamilasas son AfuGA y FvGA que tienen una proporción en masa de alrededor de 3:2 o más. Opcionalmente, la proporción en masa es alrededor de 4:1.

15

Opcionalmente, la primera y la segunda glucoamilasas son TrGA\_var2 y FvGA que tienen una proporción en masa de alrededor de 3:2 o más. Opcionalmente, la proporción en masa es alrededor de 4:1.

Opcionalmente, la primera y la segunda glucoamilasas son TrGA y AFuGA que tienen una proporción en masa de alrededor de 1:1 o menos. Opcionalmente, la proporción en masa es alrededor de 2:3.

20

Opcionalmente, el método para producir un mosto de cerveza con DP1 superior tiene la etapa adicional de añadir una enzima seleccionada del grupo que consiste en una pululanasa, una proteasa, una xilanasa, una lipasa, una celulasa, una amilasa, una glucoamilasa y una  $\beta$ -glucanasa.

25

Opcionalmente, el mosto tiene menos de alrededor de 4% de DP4/4+, menos de alrededor de 3,8% de DP4/4+, menos de alrededor de 3,5% de DP4/4+ o menos de alrededor de 3% de DP4/4+.

Opcionalmente, la sémola contiene malta.

30

Opcionalmente, la sémola contiene además maíz, arroz, sorgo, cebada, trigo, centeno, avena o tapioca o mezclas de los mismos.

Opcionalmente, el mosto de cerveza tiene alrededor de 93% o más de DP1.

35

Opcionalmente, el mosto de cerveza tiene alrededor de 94% o más de DP1.

Opcionalmente, el mosto de cerveza se fermenta para producir una cerveza. Opcionalmente, la cerveza tiene un RDF de más de 84%. Opcionalmente, la cerveza tiene un RDF de más de 85%. Opcionalmente, la cerveza tiene un RDF de más de 86%. Opcionalmente, la cerveza tiene un RDF de más de 87%. Opcionalmente, la cerveza tiene un RDF de más de 88%. Opcionalmente, la cerveza tiene un RDF de más de 89%.

40

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra un gráfico con la concentración de azúcares de DP1 obtenida en el mosto (en % de todo el azúcar) en función de la dosificación de glucoamilasa en ppm. El mosto se analizó después de una maceración de 240 minutos a 64°C. La concentración relativa de azúcares de DP1 en el mosto se muestra en la región de 90-97%. Se aplicaron tres preparaciones de glucoamilasa: AfuGA (triángulos rellenos), FvGA (círculos rellenos) y AfuGA:FvGA 1:1 (cuadrados rellenos).

45

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SEQ ID NO

50

SEQ ID NO: 1 indica la secuencia de aminoácidos madura de la glucoamilasa procedente de *Fusarium verticillioides* (FvGA).

55

SEQ ID NO: 2 indica la secuencia de aminoácidos madura de la glucoamilasa procedente de *Aspergillus fumigatus* (AfuGA).

SEQ ID NO: 3 indica la secuencia de aminoácidos madura de la glucoamilasa procedente de *Trichoderma reesii* (TrGA).

60

SEQ ID NO: 4 indica la secuencia de aminoácidos madura de la variante de glucoamilasa procedente de *Trichoderma reesii* que incluye las mutaciones L417V, T430A, Q511H, A539R y N563I (TrGA\_var1).

65

SEQ ID NO: 5 indica la secuencia de aminoácidos madura de la variante de glucoamilasa procedente de *Trichoderma reesii* que incluye las mutaciones D44R y A539R (TrGA\_var2).

## DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado entendido comúnmente por un experto normal en la técnica a la que pertenece esta divulgación. Singleton y cols., *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 2ª ed., John Wiley and Sons, Nueva York (1994) y Hale & Markham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY*, Harper Perennial, N.Y. (1991) proporcionan a un experto el significado general de muchos de los términos usados en el presente documento. Sin embargo, ciertos términos se definen posteriormente con propósitos de claridad y facilidad de referencia.

Según se usa en el presente documento, el término "glucoamilasa (EC 3.2.1.3)" se refiere a una enzima que cataliza la liberación de D-glucosa de los extremos no reductores del almidón y oligo- y polisacáridos relacionados.

Una "variante" o "variantes" se refiere a cualquier polipéptido o ácido nucleico. El término "variante" se puede usar indistintamente con el término "mutante". Las variantes incluyen inserciones, sustituciones, transversiones, truncamientos y/o inversiones en una o más posiciones en la secuencia de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente. Las expresiones "polipéptido variante", "variante de polipéptido", "polipéptido", "variante" y "enzima variante" significan un polipéptido/proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que bien tiene o bien comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de o está modificada en comparación con la secuencia de aminoácidos seleccionada, tal como SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5.

Según se usa en el presente documento, una "secuencia homóloga" e "identidad de secuencia" con respecto a una secuencia de ácido nucleico o polipéptido significa que tiene alrededor de al menos 100%, al menos 99%, al menos 98%, al menos 97%, al menos 96%, al menos 95%, al menos 94%, al menos 93%, al menos 92%, al menos 91%, al menos 90%, al menos 88%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 65%, al menos 60%, al menos 55%, al menos 50% o al menos 45% de identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico o secuencia de polipéptido cuando se alinean óptimamente para su comparación, donde la función de la posible secuencia de ácido nucleico o secuencia de polipéptido es esencialmente la misma que la de la secuencia de ácido nucleico o la secuencia de polipéptido con la que se está comparando la posible secuencia homóloga. En algunas realizaciones, las secuencias homólogas tienen entre al menos alrededor de 85% y 100% de identidad de secuencia, mientras que en otras realizaciones hay entre alrededor de 90% y 100% de identidad de secuencia y en otras realizaciones, hay al menos alrededor de 95% y 100% de identidad de secuencia.

La homología se determina usando técnicas estándar conocidas en la técnica (véanse, p. ej., Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981); Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970); Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988); programas tales como GAP, BESTHT, FASTA y TFASTA en el paquete de *software* de Wisconsin Genetics (Genetics Computer Group, Madison, WI); y Devereux y cols., *Nucleic Acid Res.*, 12: 387-395 (1984)).

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácido nucleico" o "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" se define como el porcentaje de residuos de nucleótido o residuos de aminoácido en una secuencia posible que es idéntica a los residuos de nucleótido o los residuos de aminoácido de la secuencia de partida. La identidad de secuencia se puede medir a lo largo de toda la longitud de la secuencia de partida.

Las secuencias homólogas se determinan mediante métodos de alineamiento de secuencias conocidos. Un método de alineamiento usado comúnmente es BLAST descrito por Altschul y cols., (Altschul y cols., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990); y Karlin y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787 (1993)). Un programa BLAST particularmente útil es el programa WU-BLAST-2 (véase Altschul y cols., *Meth. Enzymol.* 266: 460-480 (1996)). WU-BLAST-2 usa varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales están fijados a los valores predeterminados. Los parámetros ajustables se fijan a los siguientes valores: extensión de solapamiento = 1, fracción de solapamiento = 0,125, umbral de palabra (T) = 11. Los parámetros HSP S y HSP S2 son valores dinámicos y son establecidos por el propio programa dependiendo de la composición de la secuencia particular y la composición de la base de datos particular frente a la que se está buscando la secuencia de interés. Sin embargo, los valores se pueden ajustar para incrementar la sensibilidad. Un valor de % de identidad de secuencia de aminoácidos está determinado por el número de residuos idénticos coincidentes dividido por el número total de residuos de la secuencia "más larga" en la región alineada. La secuencia "más larga" es la que tiene los residuos más reales en la región alineada (los huecos introducidos por WU-Blast-2 para maximizar la puntuación de alineamiento se ignoran).

Otros métodos encuentran uso en el alineamiento de secuencias. Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea un alineamiento de secuencias múltiple a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineamientos progresivos por pares. También puede representar un árbol que muestra las relaciones de agrupamiento usadas para crear el alineamiento. PILEUP usa una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng y Doolittle (Feng y Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35: 351-360 (1987)). El método es similar al descrito por Higgins y Sharp (Higgins y Sharp, *CABIOS* 5: 151-153 (1989)). Parámetros de PILEUP útiles incluyen un peso de hueco predeterminado de 3,00, un peso de longitud de hueco predeterminado de 0,10 y huecos de extremos ponderados. El término "alineamiento óptimo" se refiere al alineamiento que da la puntuación de identidad más

alta.

Según se usa en el presente documento, el término "bebida de malta" incluye bebidas de malta fermentadas que forman espuma como cerveza totalmente malteada, ale, cerveza seca, pseudocerveza, cerveza ligera, cerveza baja en alcohol, cerveza baja en calorías, porter, cerveza bock, stout, licor de malta, licor de malta no alcohólico y similares. El término "bebidas de malta" también incluye bebidas de malta alternativas tales como bebidas de malta aromatizadas con frutas, p. ej., aromatizadas con cítricos, tales como bebidas de malta aromatizadas con limón, naranja, lima o frutos del bosque, bebidas de malta aromatizadas con licor, p. ej., licor de malta aromatizado con vodka, ron o tequila, o bebidas de malta aromatizadas con café, tales como licor de malta aromatizado con cafeína, y similares.

Según se usa en el presente documento, el término "cerveza" se refiere tradicionalmente a una bebida alcohólica derivada de malta, que se deriva de cebada y opcionalmente adyuvantes, tales como granos de cereal, y aromatizada con lúpulo. La cerveza se puede elaborar a partir de una variedad de granos esencialmente mediante el mismo procedimiento. Todos los almidones del grano son homopolímeros de glucosa en los que los residuos de glucosa están conectados por enlaces bien  $\alpha$ -1,4 o bien  $\alpha$ -1,6, predominando los primeros. El procedimiento para elaborar bebidas de malta fermentadas se denomina comúnmente fabricación de cerveza. Las principales materias primas usadas para elaborar estas bebidas son agua, lúpulo y malta. Además, se pueden usar adyuvantes tales como sémolas de maíz comunes, sémolas de maíz refinadas, arroz, sorgo, almidón de maíz refinado, cebada, almidón de cebada, cebada descascarillada, trigo, almidón de trigo, cereal torrefacto, escamas de cereal, centeno, avena, patata, tapioca y jarabes, tales como jarabe de maíz, jarabe de caña de azúcar, jarabe de azúcar invertido, jarabes de cebada y/o trigo y similares como fuente de almidón o tipos de azúcar fermentable. El almidón se convertirá finalmente en dextrinas y azúcares fermentables. Por diversas razones, la malta, que se produce principalmente a partir de variedades de cebada seleccionadas, tiene el mayor efecto sobre el carácter general y la calidad de la cerveza. En primer lugar, la malta es el principal agente aromatizante en la cerveza. En segundo lugar, la malta proporciona la principal porción del azúcar fermentable. En tercer lugar, la malta proporciona las proteínas, que contribuirán al cuerpo y el carácter espumoso de la cerveza. En cuarto lugar, la malta proporciona la actividad enzimática necesaria durante la maceración.

Según se usa en el presente documento, el término "lúpulo" se refiere a su uso para contribuir significativamente a la calidad de la cerveza, incluyendo la aromatización. En particular, el lúpulo (o los constituyentes del lúpulo) añaden sustancias de amargor deseables a la cerveza. Además, el lúpulo actúa como precipitante de proteínas, establece agentes conservantes y ayuda en la formación y la estabilización de la espuma.

Según se usa en el presente documento, el "procedimiento para elaborar cerveza" es uno que es muy conocido en la técnica, pero, brevemente, implica cinco etapas: (a) cocción y/o maceración de adyuvantes (b) separación y extracción del mosto (c) ebullición y lupulización del mosto (d) enfriamiento, fermentación y almacenamiento y (e) maduración, procesamiento y envasado. En la primera etapa, malta molida o triturada se mezcla con agua y se mantiene durante un período bajo temperaturas controladas para permitir que las enzimas presentes en la malta, p. ej., conviertan el almidón presente en la malta en azúcares fermentables. En la segunda etapa, el macerado se transfiere a una "cuba de purificación" o filtro del macerado donde el líquido se separa del residuo del grano. Este líquido dulce se denomina "mosto" y el residuo de grano que queda se denomina "grano gastado".

El macerado se somete típicamente a una extracción durante la separación del macerado, que implica añadir agua al macerado a fin de recuperar el extracto soluble residual del grano gastado. En la tercera etapa, el mosto se hierve vigorosamente. Esto esteriliza el mosto y ayuda a desarrollar el color, el aroma y el olor. El lúpulo se añade en algún punto durante la ebullición. En la cuarta etapa, el mosto se enfría y se transfiere a un fermentador, que bien contiene la levadura o bien al que se añade la levadura. La levadura convierte los azúcares mediante fermentación en alcohol y dióxido de carbono gaseoso; al final de la fermentación, el fermentador se refrigera o el fermentador se puede refrigerar para detener la fermentación. La levadura flocula y se retira. En la última etapa, la cerveza se enfría y se almacena durante un período, durante el cual la cerveza se clarifica y se desarrolla su sabor y cualquier material que pueda alterar la apariencia, el aroma y la vida útil de la cerveza se sedimenta. Antes del envasado, la cerveza se carbonata y, opcionalmente, se filtra y se pasteuriza. Después de la fermentación, se obtiene una bebida que habitualmente contiene de alrededor de 2% a alrededor de 10% en peso de alcohol. Los carbohidratos no fermentables no se convierten durante la fermentación y forman la mayoría de los sólidos disueltos en la cerveza final. Este residuo permanece debido a la incapacidad de las enzimas de la malta para hidrolizar los enlaces  $\alpha$ -1,6 del almidón y degradar completamente los polisacáridos no amiláceos. Los carbohidratos no fermentables aportan menos de 50 kilocalorías por cada 350 ml (12 onzas) de cerveza lager.

Según se usa en el presente documento, el término "cervezas ligeras, cervezas reducidas en calorías o cervezas bajas en calorías" se refiere a la amplia popularización reciente de bebidas de cerveza, particularmente en el mercado de EE. UU.. La FDA define que los alimentos "ligeros" tienen 1/3 menos calorías que un alimento/bebida de referencia estándar, según esta definición estas cervezas muy atenuadas tienen aproximadamente 30% menos calorías que una cerveza "normal" del fabricante. Información adicional sobre procedimientos de fabricación de cerveza convencionales pueden encontrarse en "Technology Brewing and Malting" de Wolfgang Kunze del Research and Teaching Institute of Brewing, Berlín (VLB), 3ª edición completamente actualizada, 2004, ISBN 3-

921690-49-8."

Según se usa en el presente documento, el "procedimiento para elaborar cerveza" se puede aplicar adicionalmente en la maceración de cualquier sémola.

5 Según se usa en el presente documento, el término "sémola" se refiere a cualquier material vegetal que contenga almidón y/o azúcar derivable de cualquier planta y parte de planta, incluyendo tubérculos, raíces, ramas, hojas y semillas. La sémola puede comprender grano, tal como grano de cebada, trigo, centeno, avena, maíz, arroz, milo, mijo y sorgo y, más preferiblemente, al menos 10%, o más preferiblemente al menos 15%, aún más preferiblemente al menos 25%, o lo más preferiblemente al menos 35%, tal como al menos 50%, al menos 75%, al menos 90% o incluso 100% (p/p) de la sémola del mosto se deriva de grano. En algunas realizaciones, la sémola puede comprender el material vegetal que contiene almidón y/o azúcar obtenido de raíces de yuca [*Manihot esculenta*]. La sémola puede comprender grano malteado, tal como malta de cebada. Preferiblemente, al menos 10%, o más preferiblemente al menos 15%, aún más preferiblemente al menos 25%, o lo más preferiblemente al menos 35%, tal como al menos 50%, al menos 75%, al menos 90% o incluso 100% (p/p) de la sémola del mosto se deriva de grano malteado.

20 El término "fermentación" significa, en el contexto de la fabricación de cerveza, la transformación de azúcares en el mosto, mediante enzimas de la levadura de cerveza, en etanol y dióxido de carbono con la formación de otros subproductos de fermentación.

Según se usa en el presente documento, el término "malta" se entiende como cualquier grano de cereal, tal como cebada, malteado.

25 El término "adyuvante" se entiende como la parte de la sémola que no es malta de cebada. El adyuvante puede ser cualquier material rico en carbohidratos. En el término "adyuvante" se incluye el material vegetal que contiene almidón y/o azúcar obtenido de raíces de yuca [*Manihot esculenta*].

30 El término "macerado" se entiende como una suspensión acuosa de almidón, p. ej., que comprende malta de cebada triturada, cebada triturada y/u otro adyuvante o una combinación de los mismos, mezclada con agua posteriormente para separarse en mosto + granos gastados.

35 Según se usa en el presente documento, el término "mosto" se refiere al licor no fermentado que escurre después de extraer la sémola durante la maceración.

Según se usa en el presente documento, el término "granos gastados" se refiere a los sólidos drenados que permanecen cuando la sémola se ha extraído y el mosto se ha separado del macerado.

40 Según se usa en el presente documento, el término "cerveza" se refiere a mosto fermentado, p. ej. una bebida alcohólica preparada a partir de malta de cebada, opcionalmente adyuvante y lúpulo.

45 Según se usa en el presente documento, el término "recuperación del extracto" en el mosto se define como la suma de sustancias solubles extraídas de la sémola (malta y adyuvantes) expresada en porcentaje basado en materia seca.

50 Según se usa en el presente documento, el término "pasteurización" significa la destrucción de microorganismos en solución acuosa mediante calentamiento. La ejecución de la pasteurización en el procedimiento de fabricación de cerveza es típicamente a través del uso de un pasteurizador instantáneo o un pasteurizador de túnel. Según se usa en el presente documento, el término "unidades de pasteurización o PU" se refiere a una medida cuantitativa de la pasteurización. Una unidad de pasteurización (1 PU) para la cerveza se define como una retención de calor de un minuto a 60 grados Celsius. Se calcula que:

$PU = t \times 1,393^{(T - 60)}$ , donde:

55  $t$  = tiempo, en minutos, a la temperatura de pasteurización en el pasteurizador

$T$  = temperatura, en grados Celsius, en el pasteurizador

60  $^{(T - 60)}$  representa el exponente de  $(T - 60)$

65 Se pueden usar diferentes PU mínimas dependiendo del tipo de cerveza, las materias primas y la contaminación microbiana, el fabricante y el efecto percibido sobre el aroma de la cerveza. Típicamente, para la pasteurización de cerveza, de una cerveza lager, se requieren 15-25 PU. Dependiendo del equipo de pasteurización, las temperaturas de pasteurización están típicamente en el intervalo de 64 - 72 grados Celsius con un tiempo de pasteurización calculado según esto. Información adicional puede encontrarse en "Technology Brewing and Malting" de Wolfgang Kunze del Research and Teaching Institute of Brewing, Berlín (VLB), 3ª edición

completamente actualizada, 2004, ISBN 3-921690-49-8.

Según se usa en el presente documento, el término "DP1" (grado de polimerización 1) significa glucosa o fructosa. "DP2" indica maltosa y/o isomaltosa. "DP3" significa maltotriosa, panosa e isopanosa. "DP4/4+" significa dextrina o maltooligosacáridos de un grado de polimerización de 4 o superior que no son fermentables.

Cuando se proporcione un intervalo de valores, se entiende que también se divulga específicamente cada valor intermedio, hasta el décimo de la unidad del límite inferior a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese intervalo. Cada intervalo menor entre cualquier valor indicado o valor intermedio en un intervalo indicado y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado está abarcado dentro de la divulgación. Los límites superior e inferior de estos intervalos menores pueden incluirse o excluirse independientemente en el intervalo y cada intervalo en el que cualquiera, ninguno o ambos límites están incluidos en los intervalos menores también está incluido dentro de la divulgación, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos límites incluidos también se incluyen en la divulgación.

Se describen métodos y materiales ejemplares usados en la práctica o las pruebas de la presente divulgación.

Según se usan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno(a)" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un gen" incluye una pluralidad de estos posibles agentes y la referencia a "la célula" incluye la referencia a una o más células y sus equivalentes conocidos por los expertos en la técnica, etc.

Según se usa en el presente documento, "*Trichoderma reesei*" se refiere a un hongo filamentoso del filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina. Este organismo estaba clasificado previamente como *Trichoderma longibrachiatum* y también como *Hypocrea jecorina*.

### Abreviaturas

En la divulgación y la sección experimental que sigue, se aplican las siguientes abreviaturas: GA (glucoamilasa); GAU (unidad de glucoamilasa); % en peso (porcentaje en peso); °C (grados centígrados); rpm (revoluciones por minuto); H<sub>2</sub>O (agua); dH<sub>2</sub>O (agua desionizada); aa o AA (aminoácido); kD (kilodaltons); g (gramos); µg (microgramos); mg (miligramos); µl (microlitros); ml (mililitros); mm (milímetros); µm (micrómetro); M (molar); mM (milimolar); µM (micromolar); U (unidades); V (voltios); MW (peso molecular); s (segundo o segundos); min (minuto/minutos); h (hora/horas); ABS (absorbancia); EtOH (etanol); y MTP (placa de microvaloración); N (normal); ppm (partes por millón).

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

#### General

Una búsqueda en la base de datos de UniProt (<http://www.uniprot.org/>) revelaba solamente una única entrada anotada de gen de glucoamilasa [ $\alpha$ -(1,4)-D-glucono glucohidrolasa, EC 3.2.1.3, GA] (Coutinho y Reilly, 1997) para los siguientes hongos: *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus fumigatus* y *Trichoderma reesei* (véase la tabla 1).

Tabla 1 Lista de glucoamilasas fúngicas

Glucoamilasa		
Organismo	ID de Uniprot	SEQ ID.
<i>Fusarium verticillioides</i>	<u>B0Z3Y3</u>	1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Q4WIT7	2
<i>Trichoderma reesei</i>	G0R866	3

La principal aplicación comercial de la glucoamilasa es catalizar la sacarificación de almidón para dar glucosa para el uso en industrias alimentarias y de fermentación. La producción de glucosa a partir de almidón, junto con la glucoamilasa, requiere la acción sinérgica de una serie de amilasas. Adicionalmente, se usan enzimas desramificadoras (pululanasa o isoamilasa) para acelerar el procesamiento de almidón escindiendo enlaces glicosídicos  $\alpha$ -1,6, lo que permite alcanzar un pico inicial en el rendimiento de glucosa con menos formación de subproductos (Reilly, 2006).

El uso industrial de GA se enfrenta a un problema importante a altas concentraciones de sólidos disueltos, aquí no produce toda la glucosa, sino que condensa parte de la glucosa en diversos di-, tri- y tetrasacáridos, donde previamente se especulaba que la isomaltosa [ $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucosa] era el más importante de ellos (Reilly, 1999). Previamente, también Ford y cols. (1998) demostraron con éxito un incremento en la selectividad de GA y el rendimiento de glucosa mediante una serie de mutaciones dirigidas simples y múltiples en el dominio catalítico de GA. El objetivo era modificar las dimensiones del sitio activo lo suficientemente como para dificultar la unión de isomaltosa, el subproducto más frecuente especulado, sin afectar a la unión de maltosa. Sin embargo, esto también daba como resultado una reducción de la eficacia catalítica específica para los enlaces glicosídicos  $\alpha$ -1,6- importantes para el procesamiento del almidón.

Además de la isomaltosa, se pueden formar muchos otros sacáridos menores no fermentables mediante reversión enzimática, tales como: panosa, nigerosa, kojibiosa, isomaltotriosa, isomaltotetraosa, isomaltopentaosa. En la presente solicitud, los inventores proponen el uso de varias GA con especificidad diferente inherente para obtener eficacia catalítica sinérgicamente alta y bajo nivel de azúcares no fermentables residuales. Se sabe que las glucoamilasas procedentes de diferentes fuentes tienen diversos grados de condensación y especificidad. Como lo demuestran los presentes inventores, la combinación correcta de glucoamilasa con diferente especificidad puede reducir la suma total de azúcares no fermentables, incluyendo productos de condensación producidos enzimáticamente tales como isomaltosa, panosa, nigerosa, kojibiosa, isomaltotriosa, etc. Reducir la cantidad de azúcares no fermentables puede dar como resultado la producción de cervezas aún más atenuadas. En la fabricación de cerveza, la atenuación es el porcentaje que mide la conversión de azúcares en alcohol y dióxido de carbono mediante el proceso de fermentación; una cerveza más atenuada generalmente será más seca y más alcohólica que una cerveza menos atenuada elaborada a partir del mismo mosto. Esto también puede expresarse en el término de fabricación de cerveza RDF, grado de fermentación real. El RDF mide el grado hasta el que el azúcar del mosto se ha fermentado en alcohol en la cerveza, lo que se define como atenuación. Cuanto mayor sea el porcentaje de RDF, más ligera y seca será la cerveza. Como se observa a partir de los ejemplos 6 de la presente solicitud, existe una correlación muy buena entre el % de DP1 obtenido y el RDF resultante.

Recientemente, se ha producido una amplia popularización de bebidas de cerveza denominadas cervezas ligeras, cervezas reducidas en calorías y cervezas bajas en calorías, particularmente en el mercado de los EE. UU.. Según se define en los EE. UU., estas cervezas tienen 50% o menos calorías que una cerveza "normal" del fabricante.

Según se usa en el presente documento, el término " cervezas ligeras, cervezas reducidas en calorías o cervezas bajas en calorías" se refiere a la amplia popularización reciente de bebidas de cerveza, particularmente en el mercado de los EE. UU.. Según se define en los EE. UU., estas cervezas altamente atenuadas tienen aproximadamente 50% menos calorías que una cerveza "normal" del fabricante. Información adicional sobre procedimientos de fabricación de cerveza convencionales se puede encontrar en "Technology Brewing and Malting" de Wolfgang Kunze del Research and Teaching Institute of Brewing, Berlín (VLB), 3ª edición completamente actualizada, 2004, ISBN 3-921690-49-8.

Varios tipos de cervezas ultraligeras tienen menos de 80 kilocalorías (por 350 ml (12 onzas)), tales como Budweiser Select 55, Miller Genuine Draft 64. Reducir adicionalmente los azúcares no fermentables en la maceración permitirá fermentaciones hasta un RDF superior y la producción de una cerveza aún más atenuada, con menos calorías.

Se ha descubierto que se puede producir un mosto de cerveza con un alto porcentaje de azúcar de DP1 fermentable usando una combinación de glucoamilasas. Según la presente invención, se presenta un método para producir un mosto de cerveza que tiene un incremento de azúcar de DP1 que tiene las etapas de añadir a un macerado que comprende una sémola una primera glucoamilasa, una segunda glucoamilasa y una tercera glucoamilasa, donde la primera glucoamilasa no es igual que la segunda glucoamilasa y donde la tercera glucoamilasa es diferente de dicha primera y dicha segunda glucoamilasa, donde dicha primera glucoamilasa es una glucoamilasa de *Fusarium venenatum* como la indicada en SEQ ID NO: 1 (FvGA) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma, dicha segunda glucoamilasa es una glucoamilasa de *Aspergillus fumigatus* como la indicada en SEQ ID NO: 2 (AfuGA) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma y dicha tercera glucoamilasa es una glucoamilasa variante de *Trichoderma reesei* como la indicada en SEQ ID NO:4 (TrGA\_var1) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma y donde la primera y la segunda glucoamilasas proceden de diferentes hongos filamentosos; para producir el mosto de cerveza.

La descripción detallada se continúa exponiendo un número de aspectos, realizaciones, selecciones y preferencias, todos los cuales solo son parte de la invención reivindicada en la medida que se encuentren dentro del alcance del método para producir un mosto de cerveza anterior del presente documento. Todos los otros aspectos, realizaciones, selecciones y preferencias se han de interpretar como comparativos de la invención reivindicada.

Preferiblemente, la primera y la segunda glucoamilasa se obtienen de un hongo filamentosos. Más preferiblemente, el hongo filamentosos se selecciona del grupo que consiste en *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*,

Gibberella, Holomastigotoides, Humicola, Irpex, Lentinula, Leptosphaeria, Magnaporthe, Melanocarpus, Meripilus, Mucor, Myceliophthora, Neocallimastix, Neurospora, Paecilomyces, Penicillium, Phanerochaete, Piromyces, Poitrasia, Pseudoplectania, Pseudotriconympha, Rhizomucor, Schizophyllum, Scytalidium, Talaromyces, Thermoascus, Thielavia, Tolypocladium, Trichoderma, Trichophaea, Verticillium, Volvariella y Xylaria.

En aspectos aún más preferidos de la presente descripción, la primera y la segunda glucoamilasas proceden de diferentes hongos filamentosos. Preferiblemente, el hongo filamentosos se selecciona del grupo que consiste en *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcocroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Penicillium thomii*, *Penicillium oxalicum*, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia spededonium*, *Thielavia setosa*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*. Aún más preferiblemente, el hongo filamentosos se selecciona del grupo que consiste en *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium venenatum* y *Trichoderma reesei*.

En otro aspecto más de la presente descripción, la primera y/o la segunda glucoamilasas son variantes de una glucoamilasa derivada de un hongo filamentosos. Preferiblemente, las glucoamilasas variantes se derivan de *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium venenatum* y *Trichoderma reesei*. Aún más preferiblemente, la glucoamilasa variante se deriva de *Trichoderma reesei*.

En otro aspecto preferido de la presente descripción, la primera y la segunda glucoamilasa tienen 60% o menos de identidad de secuencia. más preferiblemente, la primera y la segunda glucoamilasa tienen 58% o menos de identidad de secuencia. Aún más preferiblemente, la primera y la segunda glucoamilasa tienen 56% o menos de identidad de secuencia. Aún más preferiblemente, la primera y la segunda glucoamilasa tienen 54% o menos de identidad de secuencia. Aún más preferiblemente, la primera y dicha segunda glucoamilasa tienen 52% o menos de identidad de secuencia. En un aspecto aún más preferido de la presente invención, la primera y la segunda glucoamilasa tienen 50% o menos de identidad de secuencia.

En otro aspecto de la presente descripción, la primera y la segunda glucoamilasas se seleccionan del grupo que consiste en una glucoamilasa de *Fusarium venenatum* como la indicada en SEQ ID NO: 1 (FvGA) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma, una glucoamilasa de *Aspergillus fumigatus* como la indicada en SEQ ID NO: 2 (AfuGA) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma, una glucoamilasa de *Trichoderma reesei* como la indicada en SEQ ID NO: 3 (TrGA) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma, una primera glucoamilasa variante de *Trichoderma reesei* como la indicada en SEQ ID NO: 4 (TrGA\_var1) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma y una segunda glucoamilasa variante de *Trichoderma reesei* como la indicada en SEQ ID NO: 5 TrGA\_var2 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma.

Más preferiblemente, la primera y la segunda glucoamilasas se seleccionan del grupo que consiste en FvGA como la indicada en SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con la misma, AfuGA como la indicada en SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con la misma, TrGA como la indicada en SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con la misma, TrGA\_var1 como la indicada en SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con la misma y TrGA\_var2 como la indicada en SEQ ID NO: 5 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con la misma.

Aún más preferiblemente, la primera y la segunda glucoamilasas se seleccionan del grupo que consiste en FvGA como la indicada en SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con la misma, AfuGA como la indicada en SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con la misma, TrGA como la indicada en SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con la misma, TrGA\_var1 como la indicada en SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con la misma y TrGA\_var2 como la indicada en SEQ ID NO: 5 o una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con la misma.

17. El método según la reivindicación 16, en el que dichas primera y segunda glucoamilasas se seleccionan del grupo que consiste en FvGA como la indicada en SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene al menos 99% de identidad con la misma, AfuGA como la indicada en SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene al menos 99% de identidad con la misma, TrGA como la indicada en SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene al menos 99% de identidad con la misma, TrGA\_var1 como la indicada en SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene al menos 99% de identidad con la misma y TrGA\_var2 como la indicada en SEQ ID NO: 5 o una secuencia que tiene al menos

99% de identidad con la misma.

En aspectos aún más preferidos de la presente descripción, la primera y la segunda glucoamilasas se seleccionan del grupo que consiste en FvGA como la indicada en SEQ ID NO: 1, AfuGA como la indicada en SEQ ID NO: 2, TrGA como la indicada en SEQ ID NO: 3, TrGA\_var1 como la indicada en SEQ ID NO: 4 y TrGA\_var2 como la indicada en SEQ ID NO: 5. En aspectos incluso más preferidos de la presente descripción, la primera y dicha segunda glucoamilasas son distintas de TrGA y TrGA\_var1, TrGA\_var2 o TrGA y TrGA\_var2. En un aspecto aún más preferido de la presente descripción, la primera y dicha segunda glucoamilasas comprenden TrGA y FvGA, AFuGA y FvGA, TrGA y AFuGA o TrGA\_var2 y FvGA.

En otro aspecto de la presente descripción, la primera y dicha segunda glucoamilasas tienen una proporción predeterminada. Preferiblemente, la primera y la segunda glucoamilasas son TrGA y FvGA que tienen una proporción en masa de alrededor de 3:2 o más. Más preferiblemente, la proporción en masa es alrededor de 4:1. En otra realización preferida, la primera y la segunda glucoamilasas son AfuGA y FvGA que tienen una proporción en masa de alrededor de 3:2 o más. Más preferiblemente, la proporción en masa es alrededor de 4:1. En otra realización preferida, la primera y la segunda glucoamilasas son TrGA\_var2 y FvGA que tienen una proporción en masa de alrededor de 3:2 o más. Más preferiblemente, la proporción en masa es alrededor de 4:1. En otra realización preferida más, la primera y la segunda glucoamilasas son TrGA y AFuGA que tienen una proporción en masa de alrededor de 1:1 o menos. Más preferiblemente, la proporción en masa es alrededor de 2:3.

En otro aspecto preferido de la presente descripción, el método para producir un mosto de cerveza que tiene un incremento de DP1 comprende además añadir una enzima seleccionada del grupo que consiste en una pululanasa, una proteasa, una xilanasas, una lipasa, una celulasas, una amilasas, una tercera glucoamilasa y una  $\beta$ -glucanasas. La tercera glucoamilasa es diferente de la primera y la segunda glucoamilasas descritas en el presente documento. La primera glicoamilasa es una glicoamilasa de *Fusarium venenatum* como la indicada en SEQ ID NO: 1 (FvGA) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma, la segunda glucoamilasa es una glucoamilasa de *Aspergillus fumigatus* como la indicada en SEQ ID NO: 2 (AfuGA) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma y la tercera glicoamilasa es una glucoamilasa variante de *Trichoderma reesei* como la indicada en SEQ ID NO: 4 (TrGA\_var1) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma. La primera glicoamilasa es FvGa, la segunda glucoamilasa es AfuGA y la tercera glucoamilasa es TrGA\_var1

En otro aspecto de la presente descripción, el mosto de cerveza tiene menos de alrededor de 4% de DP4/4+. Más preferiblemente, el mosto de cerveza tiene menos de alrededor de 3,8% de DP4/4+. Aún más preferiblemente, el mosto de cerveza tiene menos de alrededor de 3,5% de DP4/4+. En el aspecto más preferido de la presente descripción, el mosto de cerveza tiene alrededor de 3% de DP4/4+.

En otro aspecto más de la presente descripción, la sémola contiene malta. Más preferiblemente, la sémola comprende además maíz, arroz, sorgo, cebada, trigo, centeno, avena o tapioca o mezclas de los mismos.

En otro aspecto más de la presente descripción, el mosto de cerveza tiene alrededor de 93% o más de DP1. Más preferiblemente, el mosto de cerveza tiene alrededor de 94% o más de DP1.

En otro aspecto más de la presente descripción, el método comprende además fermentar el mosto de cerveza para producir una cerveza. Preferiblemente, la cerveza tiene un RDF de más de 84%. Aún más preferiblemente, la cerveza tiene un RDF de más de 85%. Aún más preferiblemente, la cerveza tiene un RDF de más de 86%. Aún más preferiblemente, la cerveza tiene un RDF de más de 87%. Aún más preferiblemente, la cerveza tiene un RDF de más de 88%. Aún más preferiblemente, la cerveza tiene un RDF de más de 89%.

Para que sea eficaz en la invención ahora reivindicada, la glucoamilasa se elige de modo que retenga suficiente actividad a las temperaturas de procesamiento del procedimiento reivindicado y retenga suficiente actividad bajo las condiciones de pH moderadamente ácido de un macerado típico. Además, las glucoamilasas deben emplearse en cantidad suficiente para que sean eficaces según la presente invención.

Las glucoamilasas se pueden producir directamente a partir del organismo dado en el que residen naturalmente. Alternativamente, se pueden emplear técnicas comunes de biología molecular para clonar la secuencia génica correspondiente a la glucoamilasa y a continuación insertarse en un organismo para la expresión heteróloga. Las glucoamilasas (GA) son producidas por numerosas cepas de bacterias, hongos, levaduras y plantas. Muchas glucoamilasas fúngicas son secretadas desde la célula, por ejemplo desde cepas de *Aspergillus* (Svensson y cols., *Carlsberg Res. Commun.* 48: 529-544 (1983); Boel y cols., *EMBO J.* 3: 1097-1 102 (1984); Hayashida y cols., *Agric. Biol. Chem.* 53: 923-929 (1989); Patente de EE. UU. N° 5.024.941; Patente de EE. UU. N° 4.794.175 y el documento WO 88/09795); *Talaromyces* (Patente de EE. UU. N° 4.247.637; Patente de EE. UU. N° 6.255.084 y Patente de EE. UU. N° 6.620.924); *Rhizopus* (Ashikari y cols., *Agric. Biol. Chem.* 50: 957-964 (1986); Ashikari y cols., *App. Microbio. Biotech.* 32: 129-133 (1989) y Patente de EE. UU. N° 4.863.864); *Humicola* (documento WO 05/052148 y Patente de EE. UU. N°). El aislamiento, la clonación y la expresión de la TrGA se describen en el documento WO 2006/060062 y la Patente de EE. UU. N° 7.413.887, pueden usarse procedimientos similares para construir anfitriones de expresión heteróloga de GA de otro origen fúngico.

En un aspecto de la presente descripción, la concentración de glucoamilasa añadida está entre alrededor de 0,01 mg y alrededor de 2,0 mg por gramo de sémola total. Más preferiblemente, la concentración de glucoamilasa añadida está entre alrededor de 0,1 mg y alrededor de 0,5 mg por gramo de sémola total.

La presente divulgación se describe con más detalle en los siguientes ejemplos. Se entiende que las figuras adjuntas se consideran partes integrales de la memoria descriptiva y la descripción de la divulgación.

### Ejemplo 1 - Producción de glucoamilasas en *Trichoderma reesei*

La producción de TrGA y variantes de la misma en *Trichoderma reesei* puede llevarse a cabo esencialmente como se describe previamente en el documento WO2014029808. La expresión heteróloga de FvGA y AfuGA se puede llevar a cabo como se describe previamente para MkGA en el documento WO2013092840. El cultivo de *Trichoderma reesei* para la expresión de glucoamilasa se puede llevar a cabo esencialmente como se describe a continuación:

**400x Solución de oligoelementos:** Dilúyanse en 1000 ml de agua desmineralizada: ácido cítrico anhidro (175 g), FeSO<sub>4</sub>\*7 H<sub>2</sub>O (200 g), ZnSO<sub>4</sub>\*7 H<sub>2</sub>O (16 g), CuSO<sub>4</sub>\*5 H<sub>2</sub>O (3,2 g), MnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O (1,4 g), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0,8 g). Puede ser útil acidificar esto para tener todos los componentes en solución. La solución se filtró y se esterilizó.

**Medio de LD:** Añádanse a ~ 800 ml de agua desmineralizada: casaminoácidos (9 g), MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O (1 g), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (4,5 g), CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O (1 g), tampón de ácido piperazino-1,4-bis-propanosulfónico (PIPPS) (33 g), 400x oligoelementos de *T. reesei* (2,5 ml), ajústese el pH hasta 5,5 con NaOH 4 N. Ajústese el volumen final hasta 920 ml.

**2xAmd S Base ager** (1 litro): Mézclense KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (30 g), acetamida 1 M (20 ml), CsCl 1 M (20 ml), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O al 20% (6 ml), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O al 20% (6 ml), elementos de esporas de *T. reesei* 400x (2 ml), glucosa.H<sub>2</sub>O al 50% (80 ml). Ajústese el pH hasta 4,5 con NaOH 4 N. Llévase hasta 1 l y esterilícese por filtración. Almacénese a 4°C.

**Cultivo inicial:** se desarrollaron cepas de *Trichoderma reesei* sobre placas de agar AmdS-Base. Para producir las placas de agar, se hirvió agar de medio mínimo y, después de enfriar hasta aproximadamente 50°C, se diluyó con 2x AmdS Base 1:1 y se vertió en cápsulas de Petri. Después de la esporulación (aprox. 6-7 días), las placas se rascaron con 2 ml de Tween 80 al 0,015% en solución salina. Se añadió aproximadamente 1 ml a tubos con glicerol que contenían 500-600 µl de glicerol al 35% y se almacenaron a -80°C. Las fermentaciones de precultivo se iniciaron directamente a partir de su suspensión de esporas.

**Precultivo:** El medio se elabora añadiendo glucosa al 2,5% al medio de LD, que posteriormente se lleva hasta 1 l. Para producir biomasa, se añaden 50 µl de suspensión de esporas a 100 ml de medio (esterilizado en un matraz de agitación de 500 ml). Los matraces se incuban en un agitador giratorio a 30°C, 180 rpm durante 2 días, a continuación se usan 10 ml de suspensión para inocular un nuevo matraz de agitación con deflectores, que se incubaba bajo condiciones similares durante 1 día. El contenido de este matraz se usa para inocular un fermentador. Alternativamente, la fermentación del precultivo se iniciaba mediante un fragmento (~1 cm<sup>2</sup>) de una placa de PDA reciente con *T. reesei*.

**Cultivo principal:** Para elaborar 1 l de medio, se añadieron 40 ml de mezcla de glucosa/soforosa (Danisco, Jamsa, Finlandia) al medio de LD y se llevaron hasta 1 l. Fermentadores de 6 l que contenían 4 l de medio se inocularon con el precultivo y se desarrollaron a pH 3,5 durante aproximadamente 16 horas a 34°C, hasta que las CER/OUR (velocidad de excreción de dióxido de carbono/velocidad de captación de oxígeno) empezaban a caer. A continuación, la temperatura se redujo hasta 28°C, el pH se elevó hasta 5,5 y la fermentación se continuó durante aproximadamente 80 horas. El cultivo celular se recogió y el medio se clarificó mediante centrifugación (4000 rpm en 25 min.) y filtración (VacuCap 90, 0,2 µm). A continuación, el fermento se concentró y se almacenó a -20°C.

### Ejemplo 2 – Métodos de determinación de proteínas

Determinación de proteínas mediante Stain Free Imager Criterion

La proteína se cuantificó mediante gel de SDS-PAGE y densitometría usando el sistema de obtención de imágenes Gel Doc™ EZ. Reactivos usados en el ensayo: Tampón de muestra de Laemmli concentrado (2x) (Bio-Rad, nº de catálogo 161-0737); gel Bis-Tris al 4-12% en XT de 26 pocillos (Bio-Rad, nº de catálogo 345-0125); marcadores de proteínas "Precision Plus Protein Standards" (Bio-Rad, nº de catálogo 161- 0363); proteína BSA estándar (Thermo Scientific, nº de catálogo 23208) y SimplyBlue Safestain (Invitrogen, nº de catálogo LC 6060). El ensayo se llevó a cabo como sigue: En una placa de PCR de 96 pocillos, se mezclaron 50 µl de muestra de enzima diluida con 50 µl de tampón de muestra que contiene 2,7 mg de DTT. La placa se selló mediante película Microseal 'B' de Bio-Rad y se puso en un instrumento de PCR para ser calentada hasta 70°C durante 10 minutos. Después de que la cámara se rellenara mediante tampón de migración, el casete de gel se fijó. A continuación, se cargaron 10 µl de cada muestra y estándar (0,125-1,00 mg/ml de BSA) sobre el gel y se cargaron 5 µl de los marcadores. Después

de eso, se efectuó la electroforesis a 200 V durante 45 min.

Después de la electroforesis, el gel se enjuagó 3 veces 5 min en agua, a continuación se tiñó en Safestain durante la noche y finalmente se destiñó en agua. A continuación, el gel se transfirió al Imager. Se usó el *software* Image Lab para el cálculo de la intensidad de cada banda. Conociendo la cantidad de proteína de la muestra estándar, puede elaborarse la curva de calibración. La cantidad de muestra puede ser determinada por la intensidad de la banda y la curva de calibración. El método de cuantificación de proteína se empleó para preparar muestras de enzima glucoamilasa usadas para ensayos mostrados en los Ejemplos posteriores.

### 10 Ejemplo 3 – Análisis de azúcares mediante HPLC

Todos los estándares: glucosa, maltosa, maltotriosa y maltotetraosa se prepararon en agua doblemente destilada (ddH<sub>2</sub>O) y se filtraron a través de filtros de jeringa de 0,45 µm. Se preparó un conjunto de cada estándar que variaba en concentración de 10 a 100.000 ppm.

Todas las muestras de mosto que contenían enzimas activas se inactivaron al calentar la muestra hasta 95°C durante 10 min. Posteriormente, las muestras de mosto se prepararon en placas MTP de 96 pocillos (Corning, NY, EE. UU. de A.) y se diluyeron un mínimo de 4 veces en ddH<sub>2</sub>O y se filtraron a través de filtros de placas de 96 pocillos de 0,20 µm antes del análisis (placa filtrante de Corning, membrana hidrófila de PVDF, NY, EE. UU. de A.). Todas las muestras se analizaron por duplicado.

#### Instrumentación

Cuantificación de azúcares: DP1, DP2, DP3, DP4 y DP5+ se realizó mediante HPLC. El análisis de las muestras se llevó a cabo en un sistema de HPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific) equipado con una bomba analítica de doble gradiente DGP-3600SD, un automuestreador termostatzado WPS-3000TSL, un horno columnar termostatzado TCC-3000SD y un detector del índice de refracción RI-101 (Shodex, JM Science). Se usó el programa Chromeleon datasystem (Versión 6.80, DU10A Build 2826, 171948) para la adquisición y el análisis de datos.

#### Condiciones cromatográficas

Las muestras se analizaron usando una columna de oligosacárido RSO, reticulada al 4% con Ag<sup>+</sup> (Phenomenex, Países Bajos) equipada con una columna analítica de seguridad (Carbo-Ag<sup>+</sup> neutral, AJ0-4491, Phenomenex, Países Bajos) operada a 70°C. La columna se eluyó con agua doblemente destilada (filtrada a través de una membrana de celulosa regenerada de 0,45 µm y purgada con gas helio) a un caudal de 0,3 ml/min. El flujo isocrático de 0,3 ml/min se mantuvo durante todo el análisis con un tiempo total de ejecución de 45 min y el volumen de inyección se ajustó hasta 10 µl. Las muestras se mantuvieron a 20°C en el compartimento del automuestreador termostatzado. El eluyente se comprobó mediante un detector del índice de refracción (RI-101, Shodex, JM Science) y la cuantificación se realizó por la superficie del pico con relación a la superficie del pico del estándar dado (DP1: glucosa; DP2: maltosa; DP3: maltotriosa y los picos con un grado de maltotetraosa de cuatro o superior se usaron como estándar).

### 45 Ejemplo 4 (para ilustración)- Aplicación por pares de glucoamilasas para el incremento de la sacarificación del mosto

#### Operación de maceración para la producción de mosto

Las glucoamilasas se probaron en una operación de maceración con malta Pilsner (Pilsner malt; Fuglsang Dinamarca, Lote 13.01.2016) al 55% y sémola de maíz (Nordgetreide GmbH Lübeck, Alemania, Lote: 02.05.2016.) al 45%, usando una proporción de agua a sémola de 3,8:1. La malta Pilsner se molió en un molino Buhler Miag (ajuste 0,5 mm).

El adyuvante de maíz se licuó del siguiente modo: se mezclaron sémola de maíz (31,5 g), malta (malta Pilsner molida, 5,5 g) y agua corriente (141 g) en vasos para baños de maceración (Lockner, LG-electronics) y el pH se ajustó hasta pH 5,4 con ácido sulfúrico 2,5 M. El adyuvante se maceró con el programa; se calentó hasta 43°C y se mantuvo durante 1 minuto para la maceración; se calentó hasta 72°C durante 14,5 minutos incrementando la temperatura en 2°C/minuto; se mantuvo a 72°C durante 5 minutos; se calentó hasta 74°C durante 1 minuto incrementando la temperatura en 2°C/minuto; se mantuvo a 74°C durante 2 minutos; se calentó hasta 76°C durante 1 minuto incrementando la temperatura en 2°C/minuto; se mantuvo a 76°C durante 2 minutos; se calentó hasta 78°C durante 1 minuto incrementando la temperatura en 2°C/minuto; se mantuvo a 78°C durante 2 minutos; se calentó hasta 80°C durante 1 minuto incrementando la temperatura en 2°C/minuto; se mantuvo a 80°C durante 5 minutos; se calentó hasta 95°C durante 7,5 minutos incrementando la temperatura en 2°C/minuto; se mantuvo a 95°C durante 15 minutos y se maceró. A continuación, el adyuvante se enfrió hasta 64°C y se combinó con el macerado principal. En el macerado principal, se mezclaron malta (malta Pilsner molida, 122 g) y agua corriente (122 g) en un vaso para baños de maceración (Lochner, LG-electronics) y el pH se ajustó hasta pH 5,4 con ácido

## ES 3 027 937 T3

sulfúrico 2,5 M. El macerado principal se calentó hasta 43°C incrementando la temperatura en 2°C/minuto; se mantuvo a 43°C durante 10 minutos y se calentó hasta 64°C durante 21 minutos incrementando la temperatura en 1°C/minuto. El adyuvante y el macerado principal se combinaron y el sustrato se repartió en partes alícuotas en muestras de 15,0 g (en pequeños recipientes de vidrio Wheaton con tapa) para continuar la maceración con la adición de enzima.

Después de la adición de la enzima a la muestra de 15 g, la maceración se continuó en un baño seco a 64°C con agitación magnética durante 240 minutos, seguido de calentamiento hasta 79°C (mantenido durante 15 minutos) y el análisis de los azúcares se llevó a cabo mediante HPLC según se describe en el ejemplo 3.

Se probaron cinco glucoamilasas diferentes en cinco combinaciones por pares: TrGA (glucoamilasa de *Trichoderma reesie*), TrGA\_variante 1 (variante manipulada de proteína de glucoamilasa de *Trichoderma reesie*, que incluye las mutaciones L417V, T430A, Q511H, A539R y N563I), TrGA\_variante 2 (variante manipulada de proteína de glucoamilasa de *Trichoderma reesie*, que incluye las mutaciones D44R y A539R), AfuGA (glucoamilasa de *Aspergillus fumigatus*) y FvGA (glucoamilasa de *Fusarium verticillioides*).

La siguiente dosis de glucoamilasas se usó para obtener una conversión de almidón en aproximadamente 93% de DP1 (p. ej. glucosa y fructosa).

*Tabla 2 Concentración en ppm of GA en la aplicación al macerado para obtener una conversión de 93% de DP1*

	TrGA	TrGA_variante 1	TrGA_variante 2	AfuGA	FvGA
ppm de GA en la aplicación	74,7	78,4	173,8	60,4	120,9

Las cinco glucoamilasas se mezclaron en las 10 únicas combinaciones por pares: TrGA\_variante 2:TrGA\_variante 1, TrGA\_variante 2:TrGA, TrGA\_variante 2:AfuGA, TrGA\_variante 2:FvGA, TrGA\_variante 1:TrGA, TrGA\_variante 1:AfuGA, TrGA\_variante 1:FvGA, TrGA:AfuGA, TrGA:FvGA y AfuGA:FvGA. Por otra parte, se aplicaron proporciones variables de los pares que oscilaban: [10:0], [8:2], [6:4], [5:5], [4:6], [2:8] y [0:10]. Así, una mezcla de AfuGA:FvGA [6:4] sería igual a 0,6 x 60,4 ppm de AfuGA + 0,4 x 120,9 ppm de FvGA en la aplicación. El siguiente % relativo de DP1 liberado después de la maceración al aplicar las 10 combinaciones por pares únicas con las 7 relaciones diferentes se muestra en la tabla 3.

*Tabla 3 Concentración relativa en % de DP1 después de una maceración de 240 minutos a 64°C. Los valores están normalizados a la concentración relativa de DP1 obtenida por las glucoamilasas individuales, p. ej. [10:0] y [0:10] en cada mezcla, que se ajusta al 93%. La normalización del valor obtenido por dos glucoamilasas se pondera mediante la proporción relativa en la mezcla.*

	GA1:GA2						
	[10:0]	[8:2]	[6:4]	[5:5]	[4:6]	[2:8]	[0:10]
TrGA var 2:TrGA	93,00	93,04	92,96	92,97	92,97	93,20	93,00
TrGA var 1:TrGA	93,00	93,09	93,16	92,64	93,00	92,72	93,00
TrGA var 2:TrGA var 1	93,00	92,91	93,31	93,11	92,95	93,28	93,00
TrGA var1:FvGA	93,00	93,30	93,67	93,45	93,56	93,49	93,00
TrGA var1:AfuGA	93,00	93,56	93,30	93,88	93,74	93,52	93,00
TrGA var2:AfuGA	93,00	93,28	93,61	93,83	93,70	93,54	93,00
TrGA:AfuGA	93,00	93,30	93,79	93,62	93,99	93,65	93,00
TrGA:FvGA	93,00	94,16	93,90	93,68	94,01	93,91	93,00

	GA1:GA2						
	[10:0]	[8:2]	[6:4]	[5:5]	[4:6]	[2:8]	[0:10]
AfuGA:FvGA	93,00	94,32	93,83	93,72	93,54	93,43	93,00
TrGA var2:FvGA	93,00	94,63	94,23	93,75	93,36	93,13	93,00

La concentración relativa de DP1 después de una maceración de 240 minutos a 64°C se normaliza a la concentración obtenida por las glucoamilasas individuales solas (93%) para una mejor evaluación de las posibles sinergias por pares de los pares de glucoamilasas. Como se observa en la parte relativa de DP1 liberada en la tabla 3, el uso de una única glucoamilasa daba como resultado 93% de DP1, mientras que la gran mayoría de los pares de glucoamilasas daban como resultado una liberación de DP1 superior cuando se combinaban. Esto puede explicarse como una sinergia positiva entre dos GA diferentes, que incrementa el DP1. Sólo 7 combinaciones específicas de las 50 probadas reducían el DP1 producido, mientras que 1 se mantenía sin cambios y las restantes incrementaban el DP1. Así, varios pares de diferentes glucoamilasas mostraban sinergia, con un incremento de DP1 liberado (tan alto como 94,63% obtenido por TrGA var 2:FvGA [8:2]). Notablemente, se obtuvo una liberación de DP1 superior en todos los pares que incluían bien AfuGA o bien FvGA, mientras que se obtuvo un incremento inferior combinando TrGA con TrGA variante bien 1 o bien 2 en cualquiera de las combinaciones probadas. Esto último mostraba para algunos pares una disminución de la liberación de DP1 (<93%). Así, es obvio que se puede lograr una liberación más eficaz de DP1 durante la maceración aplicando la combinación correcta de dos glucoamilasas en comparación con la aplicación de una glucoamilasa.

#### Ejemplo 5 (para ilustración) - AfuGA y FvGA para un incremento de la sacarificación del mosto

Se probaron la AfuGA (glucoamilasa de *Aspergillus fumigatus*) y FvGA (glucoamilasa de *Fusarium verticillioides*) en la disposición descrita en el ejemplo 4 para incrementar la sacarificación del mosto. Se realizaron individualmente experimentos de respuesta a la dosis de las dos glucoamilasas junto con una respuesta a la dosis de una mezcla molar 1:1 de AfuGA y FvGA (denominada AfuGA:FvGA 1:1). Las glucoamilasas se dosificaron basándose en la cantidad total de GA en la maceración. Se aplicaron las siguientes concentraciones: AfuGA [0 ppm, 26 ppm, 52 ppm, 65 ppm, 78 ppm, 93 ppm], FvGA [0 ppm, 29 ppm, 58 ppm, 73 ppm, 88 ppm] y 1:1 AfuGA:FvGA [0 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm]. La concentración relativa de DP1 (de todos los azúcares) después de una maceración de 240 minutos a 64°C se muestra en la figura 1 para las tres preparaciones de GA.

La Figura 1 muestra que es posible obtener una concentración relativa superior de azúcar DP1 en el macerado mediante la adición tanto de FvGA como de AfuGA conjuntamente que la que puede conseguirse mediante las dos glucoamilasas individualmente. Además, la combinación de las dos glucoamilasas permite una cierta concentración de DP1 mediante una dosificación menor de glucoamilasas totales en comparación con la concentración de DP1 conseguida mediante dos glucoamilasas individualmente.

#### Ejemplo 6 (para ilustración) – Aplicación de glucoamilasas individuales y por pares en el análisis de la fabricación de cerveza con determinación del grado real de fermentación (RDF)

Las glucoamilasas se probaron en una operación de maceración con malta Pilsner (Pilsner malt; Fuglsang Dinamarca, Lote 13.01.2016) al 55% y sémola de maíz (Nordgetreide GmbH Lübeck, Alemania, Lote: 02.05.2016.) al 45%, usando una proporción de agua a sémola de 3,8:1. La malta Pilsner se molió en un molino Buhler Miag (ajuste de 0,5 mm).

El adyuvante de maíz se licuó del siguiente modo: se mezclaron sémola de maíz (31,5 g), malta (malta Pilsner molida, 5,5 g) y agua corriente (141 g) en vasos para baños de maceración (Lockner, LG-electronics) y el pH se ajustó hasta pH 5,4 con ácido sulfúrico 2,5 M. El adyuvante se maceró con el programa; se calentó hasta 43°C y se mantuvo durante 1 minuto para la maceración; se calentó hasta 72°C durante 14,5 minutos incrementando la temperatura en 2°C/minuto; se mantuvo a 72°C durante 5 minutos; se calentó hasta 74°C durante 1 minuto incrementando la temperatura en 2°C/minuto; se mantuvo a 74°C durante 2 minutos; se calentó hasta 76°C durante 1 minuto incrementando la temperatura en 2°C/minuto; se mantuvo a 76°C durante 2 minutos; se calentó hasta 78°C durante 1 minuto incrementando la temperatura en 2°C/minuto; se mantuvo a 78°C durante 2 minutos; se calentó hasta 80°C durante 1 minuto incrementando la temperatura en 2°C/minuto; se mantuvo a 80°C durante 5 minutos; se calentó hasta 95°C durante 7,5 minutos incrementando la temperatura en 2°C/minuto; se mantuvo a 95°C durante 15 minutos y se maceró. A continuación, el adyuvante se enfrió hasta 64°C y se combinó con el macerado principal. En el macerado principal, se mezclaron malta (malta Pilsner molida, 122 g) y agua corriente (122 g) en un vaso para baños de maceración (Lochner, LG-electronics) y el pH se ajustó hasta pH 5,4 con ácido sulfúrico 2,5 M.

## ES 3 027 937 T3

El macerado principal se calentó hasta 43°C incrementando la temperatura en 2°C/minuto; se mantuvo a 43°C durante 10 minutos y se calentó hasta 64°C durante 21 minutos incrementando la temperatura en 1°C/minuto. Así, se añadieron enzimas a cada vaso con 178 g de adyuvante (maíz licuado, malta y agua) cuando la temperatura alcanzaba 64°C. Después de que el macerado se mantuviera a 64°C durante 240 minutos seguía un incremento hasta 79°C en 1°C/minuto. El macerado se mantuvo finalmente a 79°C durante 15 min. Se probó el yodo negativo cuando la temperatura había alcanzado 72°C. Se apuntó el tiempo en minutos que se requería para obtener yodo negativo.

Al final de la maceración, los macerados se llevaron hasta 350 g y se filtraron. Los volúmenes de filtrado se midieron después de 30 minutos. El pH se ajustó hasta pH 5,2 con ácido sulfúrico 2,5 M y una pella de lúpulo de amargor de Hopfenveredlung, St. Johann: un contenido de 16,0% (análisis de HPLC específico para EBC 7.7 0, 10/01/2013) se añadió a cada matraz (210 g). Las muestras de mosto se hirvieron durante 60 minutos en un baño de ebullición y el mosto se enfrió hasta 17°C y se filtró. Se pesaron 100 g de cada mosto en un matraz cónico de 500 ml para fermentación añadiendo levadura recientemente producida W34/70 (Weihenstephan) al 0,5% (0,50 g) al mosto que tenía 17°C. El resto del mosto filtrado se usó para el análisis, véase posteriormente. Las muestras de mosto se fermentaron a 18°C y 150 rpm después de la adición de levadura. El análisis se realizó cuando la fermentación había finalizado.

Se probaron las siguientes combinaciones de enzimas glucoamilasa: 50 ppm de AfuGA, 50 ppm de FvGA, 50 ppm de TrGA\_var1, 50 ppm de TrGA, 25 ppm de AfuGA + 25 ppm de FvGA, 25 ppm de AfuGA + 25 ppm de TrGA\_var1, 25 ppm de FvGA + 25 ppm de TrGA\_var1 y 25 ppm de TrGA\_var1 + 25 ppm de TrGA.

En este experimento, la dosificación de glucoamilasa era constante a 50 ppm independientemente de la adición de una o la combinación de dos glucoamilasas.

Análisis del mosto: Extracto original (OE), el extracto en las muestras de mosto después de la maceración se midió usando Anton Paar (Lovis) siguiendo Dupont Standard Instruction Brewing, 23.8580-B28. Los azúcares fermentables (% total + g/100 ml) mediante HPLC eran DP1, DP2, DP3 y DP4+ se determinó después de la maceración siguiendo Dupont Standard Instruction Brewing, 23.8580-B20.

Análisis de la cerveza: el RDF se midió usando un Anton Paar (DMA 5000) siguiendo Standard Instruction Brewing, 23.8580-B28 y el alcohol mediante Dupont Standard Instruction Brewing, 23.8580-B28.

El valor del grado real de fermentación (RDF) se puede calcular según la ecuación posterior:

$$RDF (\%) = \left(1 - \frac{RE}{\rho P_{inicial}}\right) \times 100$$

Donde: RE = extracto real =  $(0,1808 \times \rho P_{inicial}) + (0,8192 \times \rho P_{final})$ ,  $\rho P_{inicial}$  es el peso específico de los mostos estandarizados antes de la fermentación y  $\rho P_{final}$  es el peso específico de los caldos fermentados expresado en grados Plato.

En el presente contexto, el grado real de fermentación (RDF) se determinó a partir del peso específico y la concentración de alcohol.

El peso específico y la concentración de alcohol se determinaron en las muestras fermentadas usando un Beer Alcoalyzer Plus y un densitómetro DMA 5000 (ambos de Paar, Gratz, Austria). Basándose en estas mediciones, se calculó el valor del grado real de fermentación (RDF) según la ecuación posterior:

$$RDF (\%) = \frac{OE - E(r)}{OE} \times 100$$

Donde: E(r) es el extracto real en grados Plato (°P) y OE es el extracto original en °P.

Extracto original (OE) El extracto en las muestras de cerveza después de la maceración se midió usando un Anton Paar (DMA 5000) siguiendo Dupont Standard Instruction Brewing, 23.8580-B28 ..

El resultado del análisis por HPLC y del extracto del mosto después de la sacarificación por diferentes glucoamilasas se muestra en la tabla 4. La composición relativa de azúcares en el mosto se muestra en la tabla 5.

Tabla 4 Análisis por HPLC y del extracto original de la composición de mosto

### ES 3 027 937 T3

	g promedio por 100 ml					OE (°P)
	DP1	DP2	DP3	DP4+	Azúcar total	
AfuGA (50 ppm)	15,84	0,32	0,12	0,74	17,04	15,82
FvGA (50 ppm)	17,27	0,57	0,23	0,84	18,91	16,94
TrGA_var1 (50 ppm)	17,17	0,56	0,12	0,68	18,53	16,81
TrGA (50 ppm)	17,00	0,43	0,14	0,97	18,54	16,90
AfuGA (25 ppm) + FvGA (25 ppm)	17,49	0,34	0,17	0,60	18,60	16,94
AfuGA (25 ppm)+ TrGA_var1 (25 ppm)	16,01	0,41	0,10	0,58	17,10	15,66
FvGA (25 ppm) + TrGA_var1 (25 ppm)	17,32	0,44	0,11	0,56	18,43	16,79
TrGA_var1 (25 ppm) + TrGA (25 ppm)	14,82	0,40	0,10	0,61	15,94	14,72

Tabla 5 Distribución relativa de azúcares a partir del análisis por HPLC del mosto

	promedio %			
	DP1	DP2	DP3	DP4+
AfuGA (50 ppm)	93,0	1,9	0,7	4,4
FvGA (50 ppm)	91,3	3,0	1,2	4,4
TrGA_var1 (50 ppm)	92,7	3,0	0,6	3,7
TrGA (50 ppm)	91,7	2,3	0,7	5,2
AfuGA (25 ppm) + FvGA (25 ppm)	94,1	1,8	0,9	3,2
AfuGA (25 ppm) + TrGA_var1 (25 ppm)	93,6	2,4	0,6	3,4
FvGA (25 ppm) + TrGA_var1 (25 ppm)	94,0	2,4	0,6	3,0
TrGA_var1 (25 ppm) + TrGA (25 ppm)	93,0	2,5	0,6	3,8

- 5 Se observa que se consigue una conversión más eficaz de almidón en DP1 con combinaciones de glucoamilasas en la maceración. Especialmente, las mezclas: 25 ppm de AfuGA + 25 ppm de FvGA, 25 ppm de AfuGA + 25 ppm de TrGA\_var1 y 25 ppm de FvGA + 25 ppm de TrGA\_var1 conducen a un incremento en la concentración de DP1 en comparación con el uso de glucoamilasas individualmente.
- 10 Después de la fermentación del caldo, se determinó el % de RDF. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6 RDF después de la fermentación del mosto producida con diferentes glucoamilasas.

	RDF (%)
AfuGA (50 ppm)	84,96
FvGA (50 ppm)	83,61
TrGA_var1 (50 ppm)	84,58
TrGA (50 ppm)	83,29
AfuGA (25 ppm) + FvGA (25 ppm)	85,31
AfuGA (25 ppm)+ TrGA_var1 (25 ppm)	85,16
FvGA (25 ppm) + TrGA_var1 (25 ppm)	85,26
TrGA_var1 (25 ppm) + TrGA (25 ppm)	84,46

Los valores de RDF obtenidos se corresponden con el análisis de la composición de azúcares en el mosto aplicado, por lo que un contenido relativamente superior de azúcar de DP1 en el mosto conduce a un valor de % de RDF superior de la fermentación. Así, las mezclas: 25 ppm de AfuGA + 25 ppm de FvGA, 25 ppm de AfuGA + 25 ppm de TrGA\_var1 y 25 ppm de FvGA + 25 ppm de TrGA\_var1 mostraban un incremento en los valores de RDF en comparación con las glucoamilasas individualmente y la mezcla TrGA\_var1 (25 ppm) + TrGA (25 ppm). Así, ciertas combinaciones de glucoamilasa pueden incrementar la capacidad de fermentación mediante una sacarificación más eficaz de almidón en DP1 (que es principalmente glucosa).

5

10 **Ejemplo 7 – Relación de secuencias de glucoamilasas**

Se muestra posteriormente un alineamiento múltiple de SEQ ID NO: 1-5 generado por el paquete de *software* Genious (Geneious® Pro 5.6.7) usando el algoritmo de alineamiento CustalW con una matriz de coste BLOSUM y un coste por apertura de hueco de 10 y un coste por extensión de 0,1.

15

```

1      10      20      30      40      50      60
|      |      |      |      |      |
-----SVDRFISIEEPIALNMLLQVHPDSCRAFTGAGAVIASPTEIRPVVYVH
-----SVEDFISIEEPIALNMLLQVHPDSCRAFTGAGAVIASPTEIRPVVYVH
-----SVETDIEEPIALNMLLQVHPDSCRAFTGAGAVIASPTEIRPVVYVH
AFQLSARATGSLDNLWHEITVALNGILANIGADNYAKAKIGLIIASPSSEFDTYII
-----SPKGSIDRFISKENFISIKVLANIGADKVRAGGAPGAVVAVSPKTEDEDTYIT

TfGA_var2 (seq ID no. 5)
-----SVDRFISIEEPIALNMLLQVHPDSCRAFTGAGAVIASPTEIRPVVYVH
TfGA (seq ID no. 3)
-----SVEDFISIEEPIALNMLLQVHPDSCRAFTGAGAVIASPTEIRPVVYVH
TfGA_var1 (seq ID no. 4)
-----SVETDIEEPIALNMLLQVHPDSCRAFTGAGAVIASPTEIRPVVYVH
AfUGA (seq ID no. 2)
AFQLSARATGSLDNLWHEITVALNGILANIGADNYAKAKIGLIIASPSSEFDTYII
FvGA (seq ID. no. 1)
-----SPKGSIDRFISKENFISIKVLANIGADKVRAGGAPGAVVAVSPKTEDEDTYIT

TfGA_var2 (seq ID no. 5)
MIRDSALVTEMLIBERPIETDAGLQRRIEQXIIAQVTLQGLSNEKOSLADGSLGEPRTE
TfGA (seq ID no. 3)
MTRGSALYFNNGLIDSEFTEYDAGLQRRLEQYITAGVTLQGLSNEKOSLADGSLGEPRTE
TfGA_var1 (seq ID no. 4)
MTRGSALYFNNGLIBERPIETDAGLQRRIEQYITAGVTLQGLSNEKOSLADGSLGEPRTE
AfUGA (seq ID no. 2)
MIRDSALVTEMLVLDLPRNC--MLQQRVLTSEYVNSQAYLQVYVNSKDSQGLASG--GLASPRYH
FvGA (seq ID. no. 1)
MTRDSALVTEMLVVEREIKG--DKSLSQRKIDETVNSQAYLQVYVNSKDSQGLASG--GLGEPRYH

TfGA_var2 (seq ID no. 5)
LELEFFTEHMRERQDCEPAKADALIGYSTWLENNHNYQSEVSNVITWIVRNDLNHYAQYH
TfGA (seq ID no. 3)
LILKEFFTEHMRERQDSEIARLAAALIGYSEWLENNHNYQSEVSNVITWIVRNDLNHYAQYH
TfGA_var1 (seq ID no. 4)
LILKEFFTEHMRERQDGEPAKADALIGYKMLRNNHNYQSEVSNVITWIVRNDLNHYAQYH
AfUGA (seq ID no. 2)
VDMKIAFTSARERFQSDGPAIRKATALIDFEMNLEINGYSYAVVHNITWIVRNDLNHYAQYH
FvGA (seq ID. no. 1)
VNIITAFTEHMRERQDGEPAKADALIGYKMLRNNHNYQSEVSNVITWIVRNDLNHYAQYH

TfGA_var2 (seq ID no. 5)
NQTGFDLREYVNSSEFTVAVCHRALVEGATLAILGQSGSAYSEVAPQVLEFLQRTWVS
TfGA (seq ID no. 3)
NQTGFDLREYVNSSEFTVAVCHRALVEGATLAILGQSGSAYSEVAPQVLEFLQRTWVS
TfGA_var1 (seq ID no. 4)
NQTGFDLREYVNSSEFTVAVCHRALVEGATLAILGQSGSAYSEVAPQVLEFLQRTWVS
AfUGA (seq ID no. 2)
SQSFFDLREYVNSSEFTVAVCHRALVEGATLAILGQSGSAYSEVAPQVLEFLQRTWVS
FvGA (seq ID. no. 1)
NRTCYDLREYVNSSEFTVAVCHRALVEGATLAILGQSGSAYSEVAPQVLEFLQRTWVS

```

	1	10	20	30	40	50	60
Trda_var2 (seq ID no. 5)	1	10	20	30	40	50	60
	SCQVDSMIFVNSRQVGDNSQVLEKRTFPAALGGDCTFQDSMAALSLKQVVDPR						
Trda (seq ID no. 5)	1	10	20	30	40	50	60
	SCQVDSMIFVNSRQVGDNSQVLEKRTFPAALGGDCTFQDSMAALSLKQVVDPR						
Trda_var1 (seq ID no. 4)	1	10	20	30	40	50	60
	SCQVDSMIFVNSRQVGDNSQVLEKRTFPAALGGDCTFQDSMAALSLKQVVDPR						
Adfda (seq ID no. 2)	1	10	20	30	40	50	60
	3--YIN--SPTDNRSDNRVLAENITFPAALGGDCTFQDSMAALSLKQVVDPR						
Evda (seq ID, no. 1)	1	10	20	30	40	50	60
	3--YIN--SPTDNRSDNRVLAENITFPAALGGDCTFQDSMAALSLKQVVDPR						
Trda_var2 (seq ID no. 5)	1	10	20	30	40	50	60
	SCQVDSMIFVNSRQVGDNSQVLEKRTFPAALGGDCTFQDSMAALSLKQVVDPR						
Trda (seq ID no. 5)	1	10	20	30	40	50	60
	SCQVDSMIFVNSRQVGDNSQVLEKRTFPAALGGDCTFQDSMAALSLKQVVDPR						
Trda_var1 (seq ID no. 4)	1	10	20	30	40	50	60
	SCQVDSMIFVNSRQVGDNSQVLEKRTFPAALGGDCTFQDSMAALSLKQVVDPR						
Adfda (seq ID no. 2)	1	10	20	30	40	50	60
	3--YIN--SPTDNRSDNRVLAENITFPAALGGDCTFQDSMAALSLKQVVDPR						
Evda (seq ID, no. 1)	1	10	20	30	40	50	60
	3--YIN--SPTDNRSDNRVLAENITFPAALGGDCTFQDSMAALSLKQVVDPR						
Trda_var2 (seq ID no. 5)	1	10	20	30	40	50	60
	SLATQELVPGTATFTLSSSTFTHLNAVSTADPTLSEANVYFADSLRGGQFPRSS						
Trda (seq ID no. 5)	1	10	20	30	40	50	60
	SLATQELVPGTATFTLSSSTFTHLNAVSTADPTLSEANVYFADSLRGGQFPRSS						
Trda_var1 (seq ID no. 4)	1	10	20	30	40	50	60
	SLATQELVPGTATFTLSSSTFTHLNAVSTADPTLSEANVYFADSLRGGQFPRSS						
Adfda (seq ID no. 2)	1	10	20	30	40	50	60
	SLATQELVPGTATFTLSSSTFTHLNAVSTADPTLSEANVYFADSLRGGQFPRSS						
Evda (seq ID, no. 1)	1	10	20	30	40	50	60
	SLATQELVPGTATFTLSSSTFTHLNAVSTADPTLSEANVYFADSLRGGQFPRSS						
Trda_var2 (seq ID no. 5)	1	10	20	30	40	50	60
	QTFSLALHETKSYRPTLAKKADIVPPDMSASATLFTLSDKSYVDSIERTATYF						
Trda (seq ID no. 5)	1	10	20	30	40	50	60
	QTFSLALHETKSYRPTLAKKADIVPPDMSASATLFTLSDKSYVDSIERTATYF						
Trda_var1 (seq ID no. 4)	1	10	20	30	40	50	60
	QTFSLALHETKSYRPTLAKKADIVPPDMSASATLFTLSDKSYVDSIERTATYF						
Adfda (seq ID no. 2)	1	10	20	30	40	50	60
	QTFSLALHETKSYRPTLAKKADIVPPDMSASATLFTLSDKSYVDSIERTATYF						
Evda (seq ID, no. 1)	1	10	20	30	40	50	60
	QTFSLALHETKSYRPTLAKKADIVPPDMSASATLFTLSDKSYVDSIERTATYF						

	1	10	20	30	40	50	60
TrGA_var2 (seq ID no. 5)	PPSQTPKPC	PPSQTPKPC	PPSQTPKPC	PPSQTPKPC	PPSQTPKPC	PPSQTPKPC	PPSQTPKPC
TrGA (seq ID no. 3)	PPSQTPKPC	PPSQTPKPC	PPSQTPKPC	PPSQTPKPC	PPSQTPKPC	PPSQTPKPC	PPSQTPKPC
TrGA_var1 (seq ID no. 4)	PPSQTPKPC	PPSQTPKPC	PPSQTPKPC	PPSQTPKPC	PPSQTPKPC	PPSQTPKPC	PPSQTPKPC
AfuGA (seq ID no. 2)	PSLLTSGS	PSLLTSGS	PSLLTSGS	PSLLTSGS	PSLLTSGS	PSLLTSGS	PSLLTSGS
FvGA (seq ID no. 1)	PSLLTSGS	PSLLTSGS	PSLLTSGS	PSLLTSGS	PSLLTSGS	PSLLTSGS	PSLLTSGS
TrGA_var2 (seq ID no. 5)	ALQWMTSA	ALQWMTSA	ALQWMTSA	ALQWMTSA	ALQWMTSA	ALQWMTSA	ALQWMTSA
TrGA (seq ID no. 3)	ALQWMTSA	ALQWMTSA	ALQWMTSA	ALQWMTSA	ALQWMTSA	ALQWMTSA	ALQWMTSA
TrGA_var1 (seq ID no. 4)	ALQWMTSA	ALQWMTSA	ALQWMTSA	ALQWMTSA	ALQWMTSA	ALQWMTSA	ALQWMTSA
AfuGA (seq ID no. 2)	ELQWMTSKA	ELQWMTSKA	ELQWMTSKA	ELQWMTSKA	ELQWMTSKA	ELQWMTSKA	ELQWMTSKA
FvGA (seq ID no. 1)	ELQWMTSKA	ELQWMTSKA	ELQWMTSKA	ELQWMTSKA	ELQWMTSKA	ELQWMTSKA	ELQWMTSKA
TrGA_var2 (seq ID no. 5)	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ
TrGA (seq ID no. 3)	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ
TrGA_var1 (seq ID no. 4)	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ
AfuGA (seq ID no. 2)	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ	TVPAVACTQ
FvGA (seq ID no. 1)	ATGSRQGS	ATGSRQGS	ATGSRQGS	ATGSRQGS	ATGSRQGS	ATGSRQGS	ATGSRQGS

5 La identidad de secuencia calculada por pares se muestra en la tabla 7. La identidad de secuencia se calcula como  $(n^{\circ} \text{ de Identidades}) / (n^{\circ} \text{ de Identidades} + n^{\circ} \text{ de Diferencias}) * 100\%$ , usando la siguiente definición:  $n^{\circ}$  de Identidades presenta el número absoluto de posiciones en las que dos secuencias tienen un residuo idéntico y  $n^{\circ}$  de Diferencias presenta el número absoluto de posiciones en las que dos secuencias tienen residuos no idénticos en el alineamiento.

10 Está claro que TrGA, TrGA\_var1 y TrGA\_var2 están estrechamente relacionados con más del 99,2% de identidad de secuencia, mientras que tanto AfuGA como FvGA están sólo lejanamente relacionados con cualquiera de las

otras GA presentes con un máximo de 57,2% y 50,7% de identidad por pares, respectivamente.

Tabla 7 Identidad de secuencia por pares en porcentaje (%) entre las diferentes glucoamilasas con seq ID no. 1-5.

	TrGA	TrGA var_2	TrGA var_1	AfuGA	FvGA
TrGA		99,7%	99,2%	57,2%	50,5%
TrGA_var2	99,7%		99,2%	57,2%	50,3%
TrGA var_1	99,2%	99,2%		57,2%	50,7%
AfuGA	57,2%	57,2%	57,2%		50,6%
FvGA	50,5%	50,3%	50,7%	50,6%	

**Ejemplo 8 (para ilustración)**

**- La sinergia de glucoamilasas sobre la generación de DP1 y relación de secuencias**

La sinergia de la aplicación de dos glucoamilasas se calculó como el DP1 adicional generado al aplicar dos glucoamilasas en comparación con una. Así, el DP1 adicional generado por 2 GA en el ejemplo 4 se usó para calcular la concentración máxima de DP1 obtenida por una combinación de dos GA restada de la concentración de DP1 de 93% obtenida por una glucoamilasa. El contenido adicional de DP1 (sinergia) se muestra en la tabla 8 (calculado a partir de los resultados del ejemplo 4) junto con la identidad de secuencia por pares en porcentaje que se muestra en el ejemplo 7.

Tabla 8 Las sinergias de glucoamilasas por pares dadas como DP1 adicional (por encima del 93%) y la identidad de secuencia por pares en porcentaje (%).

DP1 adicional en %	% ID seq	
TrGA var 2:TrGA	0,20	99,7
TrGA var 1:TrGA	0,16	99,2
TrGA var 2:TrGA var 1	0,31	99,2
TrGA var1 :FvGA	0,67	50,7
TrGA var1:AfuGA	0,88	57,2
TrGA var2:AfuGA	0,83	57,2
TrGA:AfuGA	0,99	57,2
TrGA:FvGA	1,16	50,5
AfuGA:FvGA	1,32	50,6
TrGA var2:FvGA	1,63	50,3

El resultado muestra claramente que la combinación de secuencias relacionadas más lejanamente, p. ej. TrGA:FvGA, daba lugar a una sinergia superior (1,16%) en comparación con la combinación de secuencias altamente relacionadas tales como, p. ej., TrGA:TrGA\_var1 (0,16%). Teniendo en cuenta estos hallazgos, es realmente importante que las secuencias relacionadas más lejanamente pueden tener especificidades para sustratos más diversos y, así, dar lugar a sinergias superiores en, p. ej., la operación de maceración dentro de la fabricación de cerveza.

**Ejemplo 9 - Aplicación de tres glucoamilasas en el análisis de la maceración**

Las glucoamilasas se probaron en una operación de maceración con malta Pilsner (Pilsner malt; Fuglsang Dinamarca, Lote 13.01.2016) al 55% y sémola de maíz (Nordgetreide GmbH Lübec, Alemania, Lote: 02.05.2016.) al 45%, usando una proporción de agua a sémola de 3,8:1. La malta Pilsner se molió en un molino Buhler Miag con un ajuste de 0,5 mm. El adyuvante de maíz se licuó del siguiente modo: se mezclaron sémola de maíz (31,5 g), malta (malta Pilsner molida, 5,5 g) y agua corriente (141 g) en vasos para baños de maceración (Lockner, LG-electronics) y el pH se ajustó hasta pH 5,4 con ácido sulfúrico 2,5 M. El adyuvante se maceró con el programa; se

## ES 3 027 937 T3

5 calentó hasta 43°C y se mantuvo durante 1 minuto para la maceración; se calentó hasta 72°C durante 14,5 minutos incrementando la temperatura en 2°C/minuto; se mantuvo a 72°C durante 5 minutos; se calentó hasta 74°C durante 1 minuto incrementando la temperatura en 2°C/minuto; se mantuvo a 74°C durante 2 minutos; se calentó hasta 76°C durante 1 minuto incrementando la temperatura en 2°C/minuto; se mantuvo a 76°C durante 2 minutos; se calentó hasta 78°C durante 1 minuto incrementando la temperatura en 2°C/minuto; se mantuvo a 78°C durante 2 minutos; se calentó hasta 80°C durante 1 minuto incrementando la temperatura en 2°C/minuto; se mantuvo a 80°C durante 5 minutos; se calentó hasta 95°C durante 7,5 minutos incrementando la temperatura en 2°C/minuto; se mantuvo a 95°C durante 15 minutos y se maceró. A continuación, el adyuvante se enfrió hasta 64°C y se combinó con el macerado principal. En el macerado principal, se mezclaron malta (malta Pilsner molida, 122 g) y agua corriente (122 g) en un vaso para baños de maceración (Lochner, LG-electronics) y el pH se ajustó hasta pH 5,4 con ácido sulfúrico 2,5 M. El macerado principal se calentó hasta 43°C incrementando la temperatura en 2°C/minuto; se mantuvo a 43°C durante 10 minutos y se calentó hasta 64°C durante 21 minutos incrementando la temperatura en 1°C/minuto. Así, a cada vaso con 178 g de adyuvante (maíz licuado, malta y agua) se añadieron enzimas según la tabla 9 posterior cuando la temperatura alcanzaba 64°C.

15 Tabla 9 Combinaciones de las glucoamilasas individuales añadidas a la maceración bien por pares o como combinación triple y la concentración total de glucoamilasas en ppm.

Glucoamilasas	ppm
AfuGA (15 ppm)+ FvGA (15 ppm)	30,00
AfuGA (25 ppm) + FvGA (25 ppm)	50,00
AfuGA (35 ppm)+ FvGA (35 ppm)	70,00
AfuGA (7,5 ppm)+ FvGA (7,85 ppm)+ TrGA_var1 (2,33 ppm)	17,70
AfuGA (11,25 ppm)+ FvGA (11,75 ppm)+ TrGA_var1 (3,50 ppm)	26,50
AfuGA (15 ppm)+ FvGA (15,75 ppm)+ TrGA_var1 (4,65 ppm)	35,40
AfuGA (18,75 ppm)+ FvGA (19,65 ppm)+ TrG_var1 (5,80 ppm)	44,20
AfuGA (26,25 ppm)+ FvGA (27,50 ppm)+ TrGA_var1(2,33 ppm)	61,90

20 Después de que el macerado se mantuviera a 64°C durante 240 minutos seguía un incremento hasta 79°C a 1°C/minuto. Finalmente, el macerado se mantuvo a 79°C durante 15 min. Al final de la maceración, los macerados se llevaron hasta 350 g y se filtraron. Los volúmenes de filtrado se midieron después de 30 minutos. El pH se ajustó hasta pH 5,2 con ácido sulfúrico 2,5 M y una pella de lúpulo de amargor de Hopfenveredlung. St. Johann: un contenido de 16,0% (análisis por HPLC específico para EBC 7.7 0. 10.01.2013) se añadió a cada matraz (210 g).

25 Las muestras de mosto se hirvieron durante 60 minutos en un baño de ebullición y el mosto se enfrió hasta 17°C y se analizó mediante HPLC y el extracto original (OE), extracto en las muestras de cerveza después de la maceración, se midió usando un Anton Paar (DMA 5000) siguiendo Dupont Standard Instruction Brewing, 23.8580-B28.

30 El resultado del análisis por HPLC y del extracto del mosto después de la sacarificación por diferentes glucoamilasas se muestra en la tabla 10 con la composición relativa de azúcares en el mosto.

Tabla 10 Distribución relativa de azúcares a partir del análisis por HPLC del mosto y el OE.

	promedio %				Extracto (°P) OE
	DP1	DP2	DP3	DP4+	
AfuGA (15 ppm)+ FvGA (15 ppm)	88,5	4,4	1,8	5,3	16,6

ES 3 027 937 T3

	promedio %				Extracto (°P) OE
	DP1	DP2	DP3	DP4+	
AfuGA (25 ppm) + FvGA (25 ppm)	92,8	2,1	1,1	4,0	16,61
AfuGA (35 ppm)+ FvGA (35 ppm)	92,2	2,6	1,0	4,2	16,68
AfuGA (7,5 ppm)+ FvGA (7,85 ppm) + TrGA_var1 (2,33 ppm)	79,5	11,9	1,7	6,9	16,41
AfuGA (11,25 ppm)+ FvGA (11,75 ppm) + TrGA_var1 (3,50 ppm)	90,8	3,8	1,2	4,2	16,49
AfuGA (15 ppm)+ FvGA (15,75 ppm) + TrGA_var1 (4,65ppm)	92,3	2,4	1,2	4,1	16,65
AfuGA (18,75 ppm)+ Fv GA (19,65 ppm) + TrGA_var1 (5,80 ppm)	93,2	2,2	1,0	3,6	16,68
AfuGA (26,25 ppm) + FvGA (27,50 ppm) + TrGA_var1(2,33 ppm)	93,4	2,3	0,8	3,6	16,6

Se observa que se consigue una conversión más eficaz de almidón en DP1 con una combinación triple de AfuGA + FvGA + TrGA\_var1 en comparación con AfuGA + FvGA también usada en el ejemplo 6, Por ejemplo, el uso de AfuGA (18,75 ppm), FvGA (19,65 ppm) y TrGA\_var1 (5,80 ppm) daba 93,2% de DP1 mientras que AfuGA (25 ppm) y FvGA (25 ppm) en el macerado ahora producido 92,8% de DP1.

5

SEQ ID

SEQ ID NO: 1 indica la secuencia de aminoácidos madura de la glucoamilasa procedente de Fusarium verticillioides (FvGA):

10

SPGGSSLDRFISKEADISIKGVLANI GADGKRAQGAAPGAVVASPSRTDPDYWYTWTRDSALTYKVLVER  
 FTHGDKSLQRKIDEYVSAQAKLQGVTNPSGGPESGGLGEPKFHVNLTAFTGSWGRPQRDGPPELRATALTL  
 YANWLVSHGDRSKAVNKVWPVIEKDLAYTVKFWNRTGYDLWEEVNGSSFFTLASASHRALVEGAALAKKLG  
 KSCSDCATNAPRVLCFMQSFWTGSYIDSNINVNDGRKGLDANSILSSIHTFDPSKCTDSTFQPCSSRAL  
 ANHKEVVDSEFRS IYGVNKNRGKGA AAVGRYSEDVYYDGNPWYLLATLAAAEQLYAAVYQWNKIGSITVDS  
 VSLPFFSDLVPKVSKGTYRKNSKTYKAI I KAVTSYADGFVAVVQTYTPKDGSLAEQFDKSTGTPKSAVHL  
 TWSYASFVGA AERRTG VVPPAWGESNANKVPVACEAAPACDPTTITFNVKNV DVTSDQKVYIVGGITQLSN  
 WAPADGIALEESTSTKGLWTVKVKI PSDTSFEYKYIKKTS DGTVTWESDPNNSAATGSKCGSSSTINDEW  
 R

SEQ ID NO: 2 indica la secuencia de aminoácidos madura de la glucoamilasa procedente de Aspergillus fumigatus (AfuGA):

15

ES 3 027 937 T3

APQLSARATGSLDSWLGTETTVALNGILANIGADGAYAKSAKPGIIIASPSTSEPDYYYTWTRDAALVTK  
VLVDLFRNGLGLQKVITEYVNSQAYLQTVSNPSSGGLASGGLAEPKYNVDMFTAFTGAWGRPQRDGPALRA  
TALIDFGNWLIDNGYSSYAVNNIWPIVRNDLSYVSQYWSQSGFDLWEEVNSMSFFTVAVQHRALVEGSTF  
AKRVGASCSCWCDSQAPQILCYMQSFWTGSYINANTGGGRSGKDANTVLA SIHTFDPEAGCDDTTTQPCSP  
RALANHKVYTDSEFRSVYAINSGIPQGAAVSAGRYPEDVYYNGNPWFLLTLAAAEQLYDAIYQWKKIGSIS  
ITSTSLAFFKDIYSSAAVGTYSSTSTFTDIINAVKTYADGYVSTVQAHAMNNGSLSEQFDKSSGLSLSA  
RDLTWSYAAFLIANMRRNGVVPAPWGAASANSVPSSCSMGSATGTYSTATATSWPSTLTSGSPGSTTTVQ  
TTTSTTSGTAAETACATPTAVAVTFNEIATTTYGENVYIVGSI SELGNWDTSKAVALSASKYTTSSNNLWY  
VSVTLPAAGTTFEYKYIRKESDGSIVWESDPNRSYTVPAACGVSTATENDTWQ

SEQ ID NO: 3 indica la secuencia de aminoácidos madura de la glucoamilasa procedente de *Trichoderma reesii* (TrGA).

5

SVDDFISTETPIALNNLLCNVGPDGCRAFGTSAGAVIASPSTIDPDYYMWTRDSALVFKNLID  
RFTETYDAGLQRRIEQYITAQVTLQGLSNPSGSLADGSGLGEPKFE LTKPFTGNWGRPQRDGP  
ALRAIALIGYSKWLINNNYQSTVSNVIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGF DLWEEVNGSSFFTVANQ  
HRALVEGATLAATLGQSGSAYSSVAPQVLCFLQRFWVSSGGYVDSNINTNEGRTGKDVNSVLTS  
IHTFDPNLGC DAGTFQPCSDKALS NLKVVDSEFRS IYGVNKGIPAGA AVAIGRYAEDVYYNGNP  
WYLATFAAAEQLYDAIYVWKKTGSI TTVTATSLAFFQELVPGV TAGTYSSSSSTFTNIINAVSTY  
ADGFLSEAAKYVPADGSLAEQFDRNSGTPLSALHLTWSYASFLTATARRAGIVPPSWANSSAST  
IPSTCSGASVVGSYSRPTATSFPPSQTPKPGVPSGTPYTPLPCATPTSVAVTFHEL VSTQFGQT  
VKVAGNAAALGNWSTSAVALDAVNADNHPLWIGTVNLEAGDVVEYKYINVGQDGSVTWESDP  
NHTYTVPAVACVTQVVKEDTWQS

10 SEQ ID NO: 4 indica la secuencia de aminoácidos madura de la variante de glucoamilasa procedente de *Trichoderma reesii* que incluye las mutaciones L417V, T430A, Q511H, A539R y N563I (TrGA\_var1):

SVDDFISTETPIALNNLLCNVGPDGCRAFGTSAGAVIASPSTIDPDYYMWTRDSALVFK  
NLIDRFTETYDAGLQRRIEQYITAQVTLQGLSNPSGSLADGSGLGEPKFE LTKPFTGNW  
GRPQRDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQSTVSNVIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGF DLW  
EEVNGSSFFTVANQHRALVEGATLAATLGQSGSAYSSVAPQVLCFLQRFWVSSGGYVD  
SNINTNEGRTGKDVNSVLTSIHTFDPNLGC DAGTFQPCSDKALS NLKVVDSEFRS IYGVN  
KGIPAGA AVAIGRYAEDVYYNGNPWYLATFAAAEQLYDAIYVWKKTGSI TTVTATSLAF  
FQELVPGV TAGTYSSSSSTFTNIINAVSTYADGFLSEAAKYVPADGSLAEQFDRNSGTPLS  
AVHLTWSYASFLTAAARRAGIVPPSWANSSASTIPSTCSGASVVGSYSRPTATSFPPSQTP  
KPGVPSGTPYTPLPCATPTSVAVTFHEL VSTQFGHTVKVAGNAAALGNWSTSAVALD  
AVNYRDNHPLWIGTVNLEAGDVVEYKYIIVGQDGSVTWESDPNHTYTVPAVACVTQV  
VKEDTWQS

15 SEQ ID NO: 5 indica la secuencia de aminoácidos madura de la variante de glucoamilasa procedente de *Trichoderma reesii* que incluye las mutaciones D44R y A539R (TrGA\_var2):

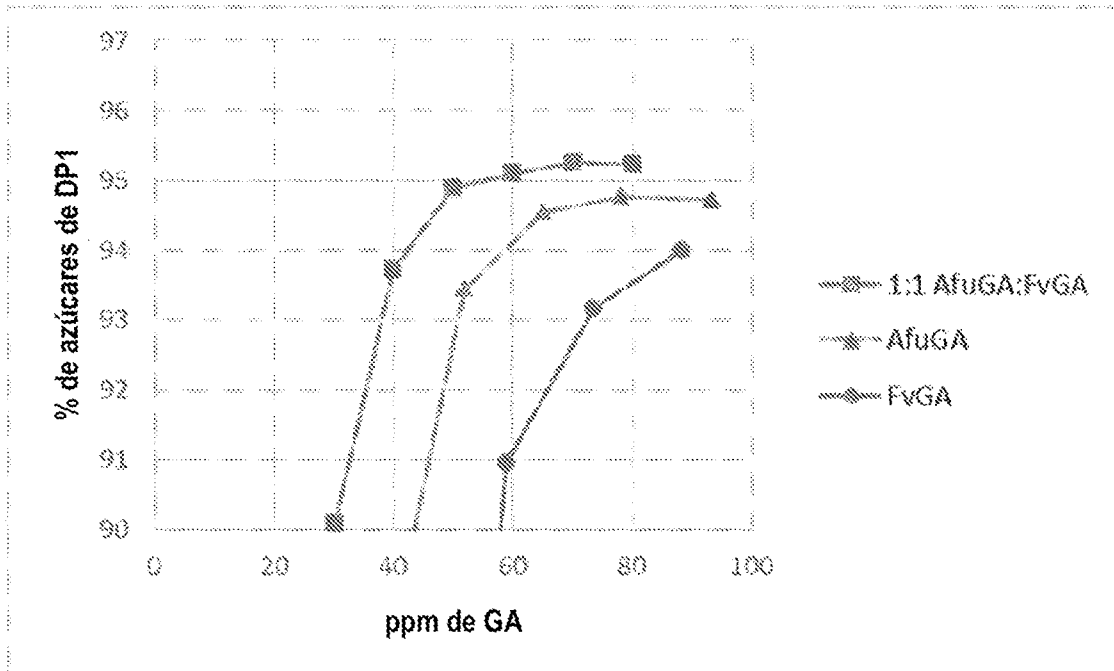
SVDDFISTETPIALNNLLCNVGPDGCRAFGTSAGAVIASPSTIRPDYYYMWTRDSALVFK  
NLIDRFTETYDAGLQRRIEQYITAQVTLQGLSNPSGSLADGSGLGEPKFELTLKPFTGNW  
GRPQRDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQSTVSNVIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGFDLW  
EEVNGSSFFTANQHRALVEGATLAATLGQSGSAYSSVAPQVLCFLQRFWVSSGGYVD  
SNINTNEGRTGKDVNSVLTSIHFTDPNLGCDAGTFQPCSDKALS NLKVVVDSFRSIYGVN  
KGIPAGAAVAIGRYAEDVYYNGNPWYLATFAAAEQLYDAIYVWKKTGSI VTATSLAF  
FQELVPGVTAGTYSSSSSTFTNIINAVSTYADGFLSEAAKYVPADGSLAEQFDRNSGTPLS  
ALHLTWSYASFLTATARRAGIVPPSWANSSASTIPSTCSGASVVGYSRPTATSFPPSQTP  
KPGVPSGTPYTPLPCATPTSVAVTFHELVSTQFGQTVKVAGNAAALGNWSTSAAVALD  
AVNYRDNHPLWIGTVNLEAGDVVEYKYINVGQDGSVTWESDPNHTYTVPAVACVTQV  
VKEDTWQS

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un mosto de cerveza que tiene un incremento de azúcar de DP1 que comprende añadir a un macerado que comprende una sémola una primera glucoamilasa, una segunda glucoamilasa y una tercera glucoamilasa, donde la primera glucoamilasa no es la misma que la segunda glucoamilasa, para producir el mosto de cerveza, donde dicha tercera glucoamilasa es diferente de dicha primera glucoamilasa y dicha segunda glucoamilasa, donde dicha primera glucoamilasa es una glucoamilasa de *Fusarium venenatum* como la indicada en SEQ ID NO: 1 (FvGA) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma, dicha segunda glucoamilasa es una glucoamilasa de *Aspergillus fumigatus* como la indicada en SEQ ID NO: 2 (AfuGA) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma y dicha tercera glucoamilasa es una glucoamilasa variante de *Trichoderma reesei* como la indicada en SEQ ID NO: 4 (TrGA\_var1) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma y donde la primera y la segunda glucoamilasas proceden de diferentes hongos filamentosos.
2. El método según la reivindicación 1, donde dicha primera y dicha segunda glucoamilasa tienen 60% o menos de identidad de secuencia.
3. El método según la reivindicación 2, donde dicha primera y dicha segunda glucoamilasa tienen 58% o menos de identidad de secuencia.
4. El método según la reivindicación 3, donde dicha primera y dicha segunda glucoamilasa tienen 56% o menos de identidad de secuencia.
5. El método según la reivindicación 4, donde dicha primera y dicha segunda glucoamilasa tienen 54% o menos de identidad de secuencia, preferiblemente, donde dicha primera y dicha segunda glucoamilasa tienen 52% o menos de identidad de secuencia, más preferiblemente, donde dicha primera y dicha segunda glucoamilasa tienen 50% o menos de identidad de secuencia.
6. El método según la reivindicación 1, donde dicha primera y dicha segunda glucoamilasas son AfuGA y FvGA que tienen una proporción en masa de alrededor de 3:2 o más.
7. El método según la reivindicación 6, donde dicha proporción en masa es alrededor de 4:1.
8. El método según la reivindicación 1, donde dicha primera glucoamilasa es FvGA, dicha segunda glucoamilasa es AfuGA y dicha tercera glucoamilasa es TrGA\_var1.
9. El método según la reivindicación 1, donde el mosto tiene menos de alrededor de 4% de DP4/4+.
10. El método según la reivindicación 9, donde el mosto tiene menos de alrededor de 3,8% de DP4/4+, preferiblemente donde el mosto tiene menos de alrededor de 3,5% de DP4/4+, más preferiblemente donde el mosto tiene alrededor de 3% de DP4/4+.
11. El método según la reivindicación 1, donde la sémola comprende malta, preferiblemente donde la sémola comprende además maíz, arroz, sorgo, cebada, trigo, centeno, avena o tapioca o mezclas de los mismos.
12. El método según la reivindicación 1, donde el mosto tiene alrededor de 93% o más de DP1, preferiblemente donde el mosto tiene alrededor de 94% o más de DP1.
13. El método según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de fermentar el mosto para producir una cerveza.
14. El método según la reivindicación 13, donde la cerveza tiene un RDF de más de 84%.
15. El método según la reivindicación 14, donde la cerveza tiene un RDF de más de 85%, preferiblemente donde la cerveza tiene un RDF de más de 86%, más preferiblemente donde la cerveza tiene un RDF de más de 87%.

## DIBUJOS

Figura 1



La Figura 1 muestra un gráfico con la concentración de azúcares de DP1 obtenida en el mosto (en % de todo el azúcar) en función de la dosificación de glucoamilasa en ppm. El mosto se analizó después de una maceración de 240 minutos a 64°C. La concentración de azúcares de DP1 se muestra en la región de 90-97%. Se aplicaron tres preparaciones de glucoamilasa: AfuGA (triángulos rellenos), FvGA (círculos rellenos) y AfuGA:FvGA 1:1 (cuadrados rellenos).