

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 929 531**

51 Int. Cl.:

C12G 1/022 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

C12N 9/96 (2006.01)

C12C 5/00 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2016 PCT/US2016/033028**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2016 WO16191169**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2016 E 16736945 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2022 EP 3298138**

54 Título: **Acetolactato descarboxilasa**

30 Prioridad:

22.05.2015 US 201562165671 P

26.05.2015 US 201562166610 P

29.05.2015 US 201562168406 P

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

30.11.2022

73 Titular/es:

DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)

Langebrogade 1
1411 Copenhagen K, DK

72 Inventor/es:

CRAMER, JACOB FLYVHOLM;
JENSEN, LENE BOJSEN;
KELLETT-SMITH, ANJA HEMMINGSEN;
BLADT, TOVE y
LEE, SANG-KYU

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 929 531 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

Acetolactato descarboxilasa

5 ANTECEDENTES

El diacetilo es en ocasiones un subproducto no deseado de procesos de fermentación de sustancias que contienen carbohidratos, por ejemplo, mosto o zumo de uva. La formación de diacetilo es lo más desventajoso debido a su olor fuerte y desagradable y en el caso de la cerveza incluso pequeñas cantidades de diacetilo de aproximadamente 0,10 a 0,15 mg/litro tienen un efecto negativo sobre el aroma y el sabor de la cerveza. Durante la maduración de la cerveza, el diacetilo se convierte en acetoína mediante reductasas en las células de levadura. La acetoína está, con respecto a un sabor y aroma aceptables en la cerveza, en concentraciones mucho mayores que el diacetilo.

La acetolactato descarboxilasa (ALDC) también puede usarse como enzima para impedir la formación de diacetilo. El α -acetolactato puede convertirse en acetoína añadiendo una enzima ALDC durante la fermentación. Sin embargo, la ALDC puede ser inestable en las condiciones de fermentación, especialmente aquellas de mostos de fermentación con un bajo contenido de malta.

El propósito de la presente invención es proporcionar enzimas ALDC que tengan una mejor estabilidad y/o actividad, y, opcionalmente, el rendimiento de enzimas ALDC que pueden recuperarse a partir de microorganismos esté mejorado.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente divulgación proporciona composiciones y procesos para enzimas ALDC. La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La información que vaya más allá del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo para información. La presente invención proporciona un método para aumentar la actividad y/o estabilidad de una enzima ALDC de EC 4.1.1.5 añadiendo cinc, en una concentración de 1 μ M a 5 mM o a una relación molar de cinc con respecto a enzima ALDC en la composición de más de 1, a un medio de fermentación y/o medio de maduración que comprende una célula huésped que produce ALDC durante una fermentación de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake. La presente invención proporciona además un medio de fermentación y/o medio de maduración de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake que comprende una composición que comprende una enzima ALDC de EC 4.1.1.5 y cinc, comprendiendo dicha composición cinc a una concentración de 1 μ M a 200 mM.

35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención se obtendrá mediante la referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de los que:

40 La **Figura 1** muestra un mapa de plásmido de *alrA(CB)RIHI-aldB* para la expresión de acetolactato descarboxilasa, *aldB*

45 La **Figura 2** muestra un gráfico que representa la actividad de ALDC en relación con cinc 0 mM frente a la concentración de cinc en mM.

La **Figura 3** muestra SDS-PAGE con muestras de *aldB* que contienen una concentración variable de $ZnSO_4$. Gel A - carril 1) Marcador de peso molecular; carril 2-7) Patrón de BSA; carril 8-9) *AldB* con $ZnSO_4$ 0 mM; carril 10-11) *AldB* con $ZnSO_4$ 0,25 mM; carril 12-13) *AldB* con $ZnSO_4$ 0,5 mM; carril 14-15) *AldB* con $ZnSO_4$ 1,0 mM; carril 16-17) *AldB* con $ZnSO_4$ 2 mM; carril 18-19) *AldB* con $ZnSO_4$ 5 mM; carril 20-21) *AldB* con $ZnSO_4$ 7,5 mM; carril 22-23) *AldB* con $ZnSO_4$ 10 mM y carril 24-25) *AldB* con $ZnSO_4$ 20 mM. Gel B - carril 1) Marcador de peso molecular; carril 2-7) Patrón de BSA; carril 8-11) *AldB* con $ZnSO_4$ 0 mM; carril 12-15) *AldB* con $ZnSO_4$ 20 mM; carril 16-17) *AldB* con $ZnSO_4$ 40 mM; carril 18-19) *AldB* con $ZnSO_4$ 60 mM; carril 20-21) *AldB* con $ZnSO_4$ 80 mM; carril 22-23) *AldB* con $ZnSO_4$ 100 mM y carril 24-25) *AldB* con $ZnSO_4$ 120 mM.

55 La **Figura 4** muestra SDS-PAGE con purificación de *aldB* producida en *B. subtilis*. Carril 1) fermento de *aldB* crudo; 2-3) *aldB* purificada a partir de Sourcel5Q. El marcador de peso molecular se muestra a la izquierda y entre el carril 1 y 2.

60 La **Figura 5** muestra el desarrollo de dicetonas vecinales (VDK) durante fermentaciones basadas en malta en presencia o ausencia de 0,03 U/ml de variantes de enzima *aldB* de mosto con diferente actividad específica: A) 919 U/mg, B) 1103 U/mg y C) 1552 U/mg de *aldB*. El desarrollo de VDK (suma de diacetilo y 2,3-pentanodiona) se siguió durante los 7 días de fermentación a 14°C. Los valores de VDK promedio se calculan a partir de muestras por duplicado y las etiquetas se muestran como inserto en la figura.

65

La **Figura 6** muestra el desarrollo de VDK en presencia de enzima aldB (0,04 U/ml de mosto) durante fermentaciones basadas en malta con diferentes niveles de Zn^{2+} en el mosto (véanse las etiquetas). El desarrollo de VDK (suma de diacetilo y 2,3-pentanodiona) se siguió durante los 7 días de fermentación a 14°C. Los valores de VDK promedio se calculan a partir de muestras por duplicado y las etiquetas se muestran como inserto en la figura.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente divulgación proporciona métodos, composiciones, aparatos y kits que comprenden enzimas ALDC que tienen una mejor estabilidad y/o actividad, y, opcionalmente, el rendimiento de enzimas ALDC que pueden recuperarse a partir de microorganismos está mejorado. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos, aparatos, composiciones y kits para el uso de iones metálicos para aumentar la estabilidad y/o actividad, y, opcionalmente, que pueden usarse adicionalmente para recuperar las enzimas (por ejemplo, enzimas ALDC) a partir de microorganismos en rendimientos mejorados.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta divulgación. Singleton, *et al.*, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20 ED., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan pericia con un diccionario general de muchos de los términos usados en esta divulgación.

Esta divulgación no está limitada por los métodos y materiales a modo de ejemplo dados a conocer en el presente documento, y cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento puede usarse en la práctica o las pruebas de realizaciones de esta divulgación. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, cualquiera secuencia de ácido nucleico está escrita de izquierda a derecha en la orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos están escritas de izquierda a derecha en la orientación amino a carboxi, respectivamente.

Los encabezados proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de esta divulgación que puedan tenerse mediante referencia a la memoria descriptiva en su totalidad. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen de manera más completa mediante referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

Debe indicarse que tal como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una proteasa" incluye una pluralidad de tales enzimas y la referencia a "la alimentación" incluye la referencia a una o más alimentaciones y equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la técnica, etcétera.

Las publicaciones discutidas en el presente documento se proporcionar únicamente por su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que tales publicaciones constituyan técnica anterior para las reivindicaciones adjuntas al mismo.

La invención está definida mediante las reivindicaciones. La información que vaya más allá del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo para información.

ALDC

En algunos aspectos, la descripción proporciona enzimas ALDC que tienen una mejor estabilidad y/o actividad, y, opcionalmente, el rendimiento de enzimas ALDC que pueden recuperarse a partir de microorganismos está mejorado. Los términos "mejor estabilidad" y "estabilidad aumentada" tal como se usan en el presente documento hacen referencia a una enzima ALDC cuya actividad ALDC se mantiene durante un periodo de tiempo más largo cuando están en presencia de un ion metálico (tal como Zn^{2+}) en comparación con la actividad ALDC de la enzima en ausencia del ion metálico. Los términos "mejor actividad" y "actividad aumentada" tal como se usan en el presente documento hacen referencia a una enzima ALDC que tiene una actividad ALDC aumentada cuando está en presencia de un ion metálico (tal como Zn^{2+}) en comparación con la actividad ALDC de la enzima en ausencia del ion metálico. El término "mejorado" en relación con el rendimiento de enzima ALDC se refiere a un aumento en la actividad ALDC que se produce cuando un microorganismo huésped está en presencia de un ion metálico (tal como Zn^{2+}) en comparación con la actividad ALDC producida cuando el microorganismo huésped está en ausencia del ion metálico. Sin querer restringirse a la teoría, el ion metálico (tal como Zn^{2+}) puede añadirse durante y/o después del proceso de cultivo (por ejemplo, producción de ALDC) con el fin de aumentar la estabilidad y/o aumentar la actividad y/o de aumentar el rendimiento de enzimas ALDC. Los términos "célula huésped", "microorganismo huésped", "cepa" y "microorganismo" pueden usarse de manera intercambiable en el presente documento.

La acetolactato descarboxilasa (ALDC) es una enzima que pertenece a la familia de las carboxilasas, que son responsables de la escisión de enlaces carbono-carbono. La acetolactato descarboxilasa cataliza la conversión de 2-acetolactato (también conocido como 2-hidroxi-2-metil-3-oxobutanoato) a 2-acetoína y libera CO₂. Los términos “ALDC” y “enzima ALDC” pueden usarse de manera intercambiable en el presente documento.

Las enzimas acetolactato descarboxilasa catalizan la reacción enzimática que pertenece a la clasificación EC 4.1.1.5 (actividad acetolactato descarboxilasa) y el ID de término de ontología génica (GO) de GO: 0047605. El ID de término de GO especifica que cualquier proteína caracterizada como que tiene este término GO asociado codifica una enzima con actividad acetolactato descarboxilasa catalítica.

Diversos genes de acetolactato descarboxilasa (tal como *alsD* o *aldB*), que codifican enzimas acetolactato descarboxilasa, se conocen en la técnica. El gen *alsD*, que codifica enzima ALDC, puede derivarse o es derivable a partir de *Bacillus subtilis*. El gen *aldB*, que codifica enzima ALDC, puede derivarse o es derivable a partir de *Bacillus licheniformis*. El gen *alsD*, que codifica enzima ALDC, puede derivarse o es derivable a partir de *Bacillus licheniformis*. UNIPROT número de registro Q65E52.1 es un ejemplo de una enzima ALDC. UNIPROT número de registro Q65E52.1 es un ejemplo de una enzima ALDC derivada o derivable a partir de *Bacillus licheniformis*. Los ejemplos de genes de acetolactato descarboxilasa incluyen, pero no se limitan a, gi|375143627|ref|YP_005006068.1| acetolactato descarboxilasa [*Niastella koreensis* OR20-10]; gi|361057673|gb|AEV96664.1| acetolactato descarboxilasa [*Niastella koreensis* OR20-10]; gi|218763415|gb|ACL05881.1| acetolactato descarboxilasa [*Desulfatibacillum alquenivorans* AK-01]; gi|220909520|ref|YP_002484831.1| acetolactato descarboxilasa [*Cyanothece* sp. PCC 7425]; gi|218782031|ref|YP_002433349.1| acetolactato descarboxilasa [*Desulfatibacillum alquenivorans* AK-01]; gi|213693090|ref|YP_002323676.1| acetolactato descarboxilasa [*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 = JCM 1222]; gi|189500297|ref|YP_001959767.1| acetolactato descarboxilasa [*Chlorobium phaeobacteroides* BS1]; gi|189423787|ref|YP_001950964.1| acetolactato descarboxilasa [*Geobacter lovleyi* SZ]; gi|172058271|ref|YP_001814731.1| acetolactato descarboxilasa [*Exiguobacterium sibiricum* 255-15]; gi|163938775|ref|YP_001643659.1| acetolactato descarboxilasa [*Bacillus weihenstephanensis* KBAB4]; gi|158522304|ref|YP_001530174.1| acetolactato descarboxilasa [*Desulfococcus oleovorans* Hxd3]; gi|57371670|ref|YP_001479659.1| acetolactato descarboxilasa [*Serratia proteamaculans* 568]; gi|150395111|ref|YP_001317786.1| acetolactato descarboxilasa [*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* JH1]; gi|150394715|ref|YP_001317390.1| acetolactato descarboxilasa [*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* JH1]; gi|146311679|ref|YP_001176753.1| acetolactato descarboxilasa [*Enterobacter* sp. 638]; gi|109900061|ref|YP_663316.1| acetolactato descarboxilasa [*Pseudoalteromonas atlantica* T6c]; gi|219866131|gb|ACL46470.1| acetolactato descarboxilasa [*Cyanothece* sp. PCC 7425]; gi|213524551|gb|ACJ53298.1| acetolactato descarboxilasa [*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 = JCM 1222]; gi|189420046|gb|ACD94444.1| acetolactato descarboxilasa [*Geobacter lovleyi* SZ]; gi|158511130|gb|ABW68097.1| acetolactato descarboxilasa [*Desulfococcus oleovorans* Hxd3]; gi|157323434|gb|ABV42531.1| acetolactato descarboxilasa [*Serratia proteamaculans* 568]; gi|145318555|gb|ABP60702.1| acetolactato descarboxilasa [*Enterobacter* sp. 638]; gi|149947563|gb|ABR53499.1| acetolactato descarboxilasa [*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* JH1]; gi|149947167|gb|ABR53103.1| acetolactato descarboxilasa [*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* JH1]; gi|163860972|gb|ABY42031.1| Acetolactato descarboxilasa [*Bacillus weihenstephanensis* KBAB4]; gi|109702342|gb|ABG42262.1| Acetolactato descarboxilasa [*Pseudoalteromonas atlantica* T6c]; gi|189495738|gb|ACE04286.1| acetolactato descarboxilasa [*Chlorobium phaeobacteroides* BS1]; gi|171990792|gb|ACB61714.1| acetolactato descarboxilasa [*Exiguobacterium sibiricum* 255-15]; gi|223932563|ref|ZP_03624564.1| acetolactato descarboxilasa [*Streptococcus suis* 89/1591]; gi|194467531|ref|ZP_03073518.1| acetolactato descarboxilasa [*Lactobacillus reuteri* 100-23]; gi|223898834|gb|EEF65194.1| acetolactato descarboxilasa [*Streptococcus suis* 89/1591]; gi|194454567|gb|EDX43464.1| acetolactato descarboxilasa [*Lactobacillus reuteri* 100-23]; gi|384267135|ref|YP_005422842.1| acetolactato descarboxilasa [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2]; gi|375364037|ref|YP_005132076.1| acetolactato descarboxilasa [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946]; gi|34079323|ref|YP_004758694.1| acetolactato descarboxilasa [*Corynebacterium variabile* DSM 44702]; gi|336325119|ref|YP_004605085.1| acetolactato descarboxilasa [*Corynebacterium resistens* DSM 45100]; gi|148269032|ref|YP_001247975.1| acetolactato descarboxilasa [*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* JH9]; gi|148268650|ref|YP_001247593.1| acetolactato descarboxilasa [*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* JH9]; gi|1485433721|ref|YP_001270742.1| acetolactato descarboxilasa [*Lactobacillus reuteri* DSM 20016]; gi|380500488|emb|CCG51526.1| acetolactato descarboxilasa [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2]; gi|371570031|emb|CCF06881.1| acetolactato descarboxilasa [*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946]; gi|340533141|gb|AEK35621.1| acetolactato descarboxilasa [*Corynebacterium variabile* DSM 44702]; gi|336101101|gb|AEI08921.1| acetolactato descarboxilasa [*Corynebacterium resistens* DSM 45100]; gi|148530406|gb|ABQ82405.1| acetolactato descarboxilasa [*Lactobacillus reuteri* DSM 20016]; gi|147742101|gb|ABQ50399.1| acetolactato descarboxilasa [*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* JH9]; gi|147741719|gb|ABQ50017.1| acetolactato descarboxilasa [*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* JH9]; gi|392529510|ref|ZP_10276647.1| acetolactato descarboxilasa [*Carnobacterium maltaromaticum* ATCC 35586]; gi|366054074|ref|ZP_09451796.1| acetolactato descarboxilasa [*Lactobacillus suebicus* KCTC 3549]; gi|339624147|ref|ZP_08659936.1| acetolactato descarboxilasa [*Fructobacillus jructosus* KCTC 3544]; y gi|336393727|ref|ZP_08575126.1| acetolactato descarboxilasa [*Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* KCTC 3535]. UNIPROT n.º de registro P23616.1 (Diderichsen *et al.*, J Bacteriol. (1990) 172(8): 4315) es un ejemplo de una

enzima ALDC. UNIPROT número de registro P23616.1 es un ejemplo de una enzima ALDC derivada o derivable a partir de *Bacillus brevis*.

5 En algunas realizaciones, la invención se refiere a enzimas ALDC de *Lactobacillus casei* (Godtfredsen 1984), *Brevibacterium acetylicum* (Oshiro, 1989), *Lactococcus lactis* (Vincent Phalip 1994), *Leuconostoc lactis* (O sullivan, 2001), *Enterobacter aerogenes* (Blomquist, 1993), *Bacillus subtilis* (Renna, 1993), *Bacillus brevis* (Svendsen, 1989) y *Lactococcus lactis DX* (Yuxing, 2014). En algunas realizaciones, la enzima ALDC es de *Lactobacillus casei*, *Brevibacterium acetylicum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Lactococcus lactis DX* o *Bacillus licheniformis*. Tal como se usa en el presente documento, el término “enzima ALDC es de” se refiere a que la enzima ALDC se deriva o es derivable a partir de.

10 Debe entenderse que cualquier enzima ALDC adecuada, es decir ALDC producida a partir de cualquier microorganismo cuya actividad depende de iones metálicos, puede usarse según la invención. En algunas realizaciones, la ALDC usada en los métodos y composiciones descritos en el presente documento es una ALDC de *Bacillus brevis* o *Bacillus licheniformis*.

15 La actividad ALDC de la composición enzimática según la descripción se mide mediante los ensayos de ALDC tal como se describen en el presente documento o cualquier ensayo adecuado conocido en la técnica. El ensayo estándar se lleva a cabo a pH 6.0, y puede realizarse a diferentes valores de pH y temperaturas para la caracterización y especificación adicionales de enzimas.

20 Una unidad de actividad ALDC se define como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de acetoina por minuto en las condiciones del ensayo (por ejemplo, pH 6,0 (o tal como se especifique) y 30°C).

25 En algunas realizaciones, la ALDC es un derivado de ALDC. En algunas realizaciones, el derivado de ALDC está caracterizado por el hecho de que la ALDC en un medio acuoso se trata con o se ha tratado con glutaraldehído. En algunas realizaciones, la ALDC se trata con o se ha tratado con glutaraldehído en una concentración que corresponde a entre 0,1 y 5 g de glutaraldehído por e de proteína de ALDC pura, preferiblemente que corresponde a entre 0,25 y 2 g de glutaraldehído por g de proteína de ALDC pura.

30 En algunas realizaciones, la enzima ALDC comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% de identidad con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8 o cualquier fragmento funcional de las mismas. En algunas realizaciones, la enzima ALDC está codificada por una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% de identidad con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6 o cualquier fragmento funcional de las mismas.

35 En algunas realizaciones, la enzima tiene un óptimo de temperatura en el intervalo de 5-80°C, tal como en el intervalo de 5-40°C o 15-80°C, tal como en el intervalo 20-80°C, tal como en el intervalo 5-15°C, 10-40°C, 10-50°C, 15-20°C, 45-65°C, 50-65°C, 55-65°C o 60-80°C. En algunas realizaciones, la enzima tiene un óptimo de temperatura de aproximadamente 60°C.

40 En algunas realizaciones, la enzima tiene un número total de aminoácidos de menos de 350, tal como menos de 340, tal como menos de 330, tal como menos de 320, tal como menos de 310, tal como menos de 300 aminoácidos, tal como en el intervalo de 200 a 350, tal como en el intervalo de 220 a 345 aminoácidos.

45 En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la enzima tiene al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácido en comparación con una secuencia de aminoácidos cualquiera seleccionada de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o cualquier fragmento funcional de las mismas.

50 En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la enzima tiene un máximo de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácido en comparación con una secuencia de aminoácidos cualquiera seleccionada de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o cualquier fragmento funcional de las mismas.

55 En algunas realizaciones, la enzima comprende la secuencia de aminoácidos identificada por una cualquiera de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8, o cualquier fragmento funcional de las mismas.

60 En algunas realizaciones, los medios y métodos según la invención comprenden una cualquiera o más enzima adicional. En algunas realizaciones, la una o más enzima adicional se selecciona de la lista que consiste en acetolactato reductoisomerasas, acetolactato isomerasas, amilasa, glucoamilasa, hemicelulasa, celulasa, glucanasa, pululanasa, isoamilasa, endo-glucanasa y enzimas accesorias hidrolíticas de beta-glucano relacionadas, xilanasas, enzimas accesorias de xilanasas (por ejemplo, arabinofuranosidasa, ácido ferúlico esterasa, xilano acetilesterasa) y proteasa.

En algunas realizaciones, los medios y métodos según la invención comprenden una enzima que presenta actividad ALDC, estando la actividad de dicha enzima ALDC en el intervalo de 950 a 2500 unidades por mg de proteína. En algunas realizaciones, los medios y métodos según la invención comprenden una enzima que presenta actividad ALDC, estando la actividad de dicha enzima ALDC en el intervalo de 1000 a 2500 unidades por mg de proteína. En algunas realizaciones, los medios y métodos según la invención comprenden una enzima que presenta actividad ALDC, estando la actividad de dicha enzima ALDC en el intervalo de 1500 a 2500 unidades por mg de proteína. En algunas realizaciones, la enzima que presenta actividad ALDC es una enzima que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de identidad con una cualquiera seleccionada de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o cualquier fragmento funcional de las mismas. En algunas realizaciones, la enzima que presenta actividad ALDC está codificada por una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 80% de identidad con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o cualquier fragmento funcional de las mismas.

Iones metálicos

En un aspecto, la invención proporciona métodos que comprenden enzimas ALDC que tienen una mejor estabilidad y/o actividad.

Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que el tratamiento de ALDC composiciones con ciertos iones metálicos a ciertas concentraciones proporciona enzimas ALDC que tienen una mejor estabilidad y/o actividad, y, opcionalmente, el rendimiento de actividad ALDC que puede recuperarse a partir de microorganismos está mejorado.

En algunas realizaciones, el radio atómico para el ion metálico es de aproximadamente 140 pm a aproximadamente 255 pm. En algunas realizaciones, el radio atómico para el ion metálico es de aproximadamente 140 pm a aproximadamente 165 pm. En algunas realizaciones, el radio atómico para el ion metálico es de aproximadamente 140 pm a aproximadamente 150 pm. En algunas realizaciones, el radio atómico para el ion metálico es de aproximadamente 142 pm a aproximadamente 146 pm.

Solo para información, los ejemplos de iones metálicos no según la invención reivindicada incluyen Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} y Fe^{2+} y combinaciones de los mismos. En los medios y métodos de la invención, el ion metálico es Zn^{2+} . El término "cinc" tal como se usa en el presente documento puede ser intercambiable con el término " Zn^{2+} ". El término "metal" tal como se usa en el presente documento puede ser intercambiable con el término "ion metálico". El término "metal" tal como se usa en el presente documento puede hacer referencia a compuestos que comprenden el metal seleccionado del grupo que consiste en cinc, magnesio, manganeso, cobalto, cobre, bario, calcio y hierro; los compuestos que comprenden estos metales son una fuente de los respectivos iones. El término "cinc" tal como se usa en el presente documento se refiere a compuestos que comprenden cinc, tales compuestos son una fuente de iones Zn^{2+} . El sulfato de cinc ($ZnSO_4$) es un ejemplo de cinc tal como se hace referencia en el presente documento y es un ejemplo de una fuente de iones Zn^{2+} . El sulfato de magnesio ($MgSO_4$) es un ejemplo de magnesio tal como se hace referencia en el presente documento y es un ejemplo de una fuente de iones Mg^{2+} . El sulfato de manganeso(II) ($MnSO_4$) es un ejemplo de manganeso tal como se hace referencia en el presente documento y es un ejemplo de una fuente de iones Mn^{2+} . El cloruro de cobalto(II) ($CoCl_2$) es un ejemplo de cobalto tal como se hace referencia en el presente documento y es un ejemplo de una fuente de iones Co^{2+} . El sulfato de cobre(II) ($CuSO_4$) es un ejemplo de cobre tal como se hace referencia en el presente documento y es un ejemplo de una fuente de iones Cu^{2+} . El sulfato de bario ($BaSO_4$) es un ejemplo de bario tal como se hace referencia en el presente documento y es un ejemplo de una fuente de iones Ba^{2+} . El sulfato de calcio ($CaSO_4$) es un ejemplo de calcio tal como se hace referencia en el presente documento y es un ejemplo de una fuente de iones Ca^{2+} . El sulfato de hierro(II) ($FeSO_4$) es un ejemplo de hierro tal como se hace referencia en el presente documento y es un ejemplo de una fuente de iones Fe^{2+} .

Los presentes inventores han encontrado que iones metálicos tales como Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{2+} aumentan la estabilidad de enzima ALDC en diferentes formulaciones (véanse los ejemplos), y también mejoran los rendimientos de recuperación a partir de microorganismos cuando los iones metálicos se usan durante la producción de la enzima en los medios de cultivo. Por tanto, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos que aumentan los rendimientos de recuperación, la estabilidad y/o actividad de enzimas ALDC que pueden usarse entonces, por ejemplo, para producir productos fermentados tal como en la elaboración de cerveza.

En algunas realizaciones, la enzima ALDC tiene una actividad específica de al menos aproximadamente 900 unidades por mg de proteína (U/mg), al menos aproximadamente 1000 U/mg, al menos aproximadamente 1500 U/mg, al menos aproximadamente 2000 U/mg, al menos aproximadamente 3000 U/mg, al menos aproximadamente 5000 U/mg, al menos aproximadamente 6000 U/mg, al menos aproximadamente 7000 U/mg, al menos aproximadamente 8000 U/mg, al menos aproximadamente 8500 U/mg, al menos aproximadamente 9000 U/mg, al menos aproximadamente 9500 U/mg o al menos aproximadamente 10000 U/mg tal como se mide mediante los ensayos descritos en el presente documento o cualquier ensayo adecuado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, la enzima ALDC tiene una actividad ALDC en el intervalo de aproximadamente 950 a 2500 unidades por mg de proteína (U/mg), de aproximadamente 1000 a 2500 U/mg o de aproximadamente 1500 a 2500 U/mg tal como se mide mediante los ensayos descritos en el presente documento o cualquier ensayo adecuado conocido en la técnica. En algunas

realizaciones, las composiciones de ALDC según la descripción comprenden una enzima ALDC con actividad ALDC de al menos aproximadamente 900 unidades por gramo de producto, al menos aproximadamente 1000 U/g, al menos aproximadamente 1500 U/g, al menos aproximadamente 2000 U/g, al menos aproximadamente 3000 U/g, al menos aproximadamente 5000 U/g, tal como al menos aproximadamente 6000 U/g, tal como al menos aproximadamente 7000 U/g, tal como al menos aproximadamente 8000 U/g, tal como al menos aproximadamente 8500 U/g, tal como al menos aproximadamente 9000 U/g, tal como al menos aproximadamente 9500 U/g, tal como al menos aproximadamente 10000 U/g tal como se mide mediante los ensayos descritos en el presente documento o cualquier ensayo adecuado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, se usa una actividad ALDC diferente, por ejemplo, dependiendo del contenido de acetolactato y los requisitos de condiciones, por ejemplo, para la elaboración de cerveza. En algunas realizaciones, las composiciones de ALDC según la descripción comprenden una enzima ALDC con actividad ALDC de al menos aproximadamente 8000 U/g.

En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC y un ion metálico, estando presente el ion metálico a una concentración de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 200 mM, tal como de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 200 mM, o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 500 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 100 μM , o de aproximadamente 15 μM a aproximadamente 50 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 150 mM, o de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 150 mM, o de aproximadamente 20 μM a aproximadamente 120 mM, o de aproximadamente 25 μM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 25 μM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 25 μM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 25 μM a aproximadamente 50 μM , o de aproximadamente 100 μM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 250 μM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC y un ion metálico, estando presente el ion metálico a una concentración de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 300 μM , tal como de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 50 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 25 μM . En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC y un ion metálico, estando presente el ion metálico a una concentración de aproximadamente 60 μM a aproximadamente 150 μM , o de aproximadamente 25 μM a aproximadamente 150 μM . En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC y un ion metálico, estando presente el ion metálico a una concentración de aproximadamente 100 μM a aproximadamente 200 mM. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC y un ion metálico, estando presente el ion metálico a una concentración de aproximadamente 100 μM a aproximadamente 20 mM. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC y un ion metálico, estando presente el ion metálico a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM.

En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC y cinc, estando presente el cinc a una concentración de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 200 mM, tal como aproximadamente de 1 μM a aproximadamente 500 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 100 μM , o de aproximadamente 15 μM a aproximadamente 50 μM , o de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 150 mM, o de aproximadamente 20 μM a aproximadamente 120 mM, o de aproximadamente 25 μM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 25 μM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 25 μM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 25 μM a aproximadamente 50 μM , o de aproximadamente 100 μM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 250 μM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 500 μM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC y cinc, estando presente el cinc a una concentración de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 300 μM , tal como de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 300 μM o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 25 μM . En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC y cinc, estando presente el cinc a una concentración de aproximadamente 25 μM a aproximadamente 150 μM o de aproximadamente 60 μM a aproximadamente 150 μM . En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC y cinc, estando presente el cinc a una concentración de aproximadamente 100 μM a aproximadamente 20 mM. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC y cinc, estando presente el cinc a una concentración de aproximadamente 100 μM a aproximadamente 10 mM. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC y cinc, estando presente el cinc a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM.

En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC y cinc, estando presente el cinc a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 3 mM, o de aproximadamente 0,75 mM a aproximadamente 4 mM, o de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 5 mM, o de aproximadamente 0,25 mM a aproximadamente 7,5 mM, o de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM. En algunas realizaciones, la actividad de dicha enzima ALDC está en el intervalo de 950 a 2500 unidades por mg de proteína, o de 1000 a 2500 unidades por mg de proteína, o de 1500 a 2500 unidades por mg de proteína.

En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC y cinc, siendo la relación molar de cinc con respecto a enzima mayor de 1 tal como 2:1, o 3:1, o 5:1, o 10:1, o 20:1 o 30:1, o 50:1, o 60:1, o 100:1, o 150:1, o 200:1, o 250:1, o 500:1. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC y cinc, siendo la relación molar de cinc con respecto a enzima de 2:1 o mayor. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC y cinc, siendo la relación molar de cinc con respecto a enzima de 5:1 o mayor. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC y cinc, siendo la relación molar de cinc con respecto a enzima de 10:1 o mayor. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC y cinc, siendo la relación molar de cinc con respecto a enzima de 20:1 o mayor. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC y cinc, siendo la relación molar de cinc con respecto a enzima de 30:1 o mayor. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC y cinc, siendo la relación molar de cinc con respecto a enzima de 60:1 o mayor. La concentración molar de, por ejemplo, Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} u otros iones metálicos en disolución puede determinarse mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) o técnicas similares. La concentración molar de la enzima ALDC puede determinarse usando el sistema de SDS-PAGE Criterion (tal como se describe en los ejemplos) y la secuencia de aminoácidos.

En algunas realizaciones, la enzima ALDC es un derivado de ALDC. En algunas realizaciones, el derivado de ALDC es una enzima ALDC tratada con glutaraldehído. En algunas realizaciones, la enzima ALDC se trata con glutaraldehído a una concentración que corresponde a de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 g de glutaraldehído por g de enzima ALDC pura.

En algunas realizaciones, la actividad de la enzima ALDC está en el intervalo de 950 a 2500 unidades por mg de proteína. En algunas realizaciones, la actividad de dicha enzima ALDC está en el intervalo de 1000 a 2500 unidades por mg de proteína. En algunas realizaciones, la actividad de dicha enzima ALDC está en el intervalo de 1500 a 2500 unidades por mg de proteína. Por tanto, en algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC, estando la enzima ALDC en el intervalo de 950 a 2500 unidades por mg de proteína o de 1000 a 2500 unidades por mg de proteína o de 1500 a 2500 unidades por mg de proteína.

En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC y cinc, estando presente el cinc a una concentración de aproximadamente 100 μM a aproximadamente 20 mM, y estando la actividad de dicha enzima ALDC en el intervalo de 1000 a 2500 unidades por mg de proteína. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una enzima ALDC o un derivado de ALDC y cinc, estando presente el cinc a una concentración de aproximadamente 250 μM a aproximadamente 20 mM, y estando la actividad de dicha enzima ALDC en el intervalo de 1000 a 2500 unidades por mg de proteína.

En algunas realizaciones, las composiciones de enzima ALDC comprenden además al menos una enzima o derivado de enzima adicional seleccionado del grupo que consiste en acetolactato reductoisomerasas, acetolactato isomerasas, amilasa, glucoamilasa, hemicelulasa, celulasa, glucanasa, pululanasa, isoamilasa, endo-glucanasa y enzimas accesorias hidrolíticas de beta-glucano relacionadas, xilanasas, enzimas accesorias de xilanasas (por ejemplo, arabinofuranosidasa, ácido ferúlico esterasa y xilano acetilesterasa) y proteasa.

En algunas realizaciones, las composiciones de enzima ALDC descritas en el presente documento se usan durante la fermentación y/o maduración de un proceso de preparación de bebida, por ejemplo, cerveza y vino, para reducir los niveles de diacetilo. Los términos "composición de enzima ALDC", "composición que comprende una enzima ALDC" y "composición que comprende ALDC" tal como se usan en el presente documento hacen referencia a composiciones que comprenden la enzima ALDC. La composición puede estar en forma de una disolución. Tal como se usan en el presente documento, los términos "composición de enzima ALDC" y "composiciones que comprenden ALDC" son mutuamente exclusivos con medio (tal como medios de cultivo, medios de fermentación o medios de maduración) que comprenden microorganismos que expresan ALDC y/o capaces de expresar ALDC cuando se cultivan en condiciones que permiten la expresión de la enzima. Los ejemplos de composiciones de enzima ALDC y composiciones que comprenden ALDC incluyen composiciones que comprenden ALDC en una forma purificada. ALDC puede purificarse a partir de un medio que comprende microorganismos capaces de expresar ALDC, habiéndose cultivado dicho medio en condiciones que permiten la expresión de ALDC. El término "purificada" significa que la ALDC está presente a un alto nivel. Preferiblemente, la ALDC es el componente predominante presente en la composición. Preferiblemente, la ALDC está presente a un nivel de al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95% o al menos aproximadamente el 98%, determinándose dicho nivel en base a peso seco/peso seco con respecto a la composición total en consideración. En algunas realizaciones, una composición de enzima ALDC comprende además un ion metálico tal como cinc.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "bebida" y "producto de bebida(s)" incluyen bebidas fermentadas que forman espuma tales como cerveza elaborada con un 100% de malta, cerveza elaborada según diferentes tipos de regulaciones, *ale*, cerveza seca, bebida afín a la cerveza, cerveza light, cerveza con bajo contenido en alcohol, cerveza baja en calorías, *porter*, cerveza *bock*, *stout*, licor de malta, cerveza sin alcohol, licor de malta sin alcohol y similares. El término "bebidas" o "producto de bebidas" también incluye cerveza que no forma espuma y bebidas de malta alternativas tales como bebidas de malta con aroma de frutas, por ejemplo, con aroma cítrico, tal como bebidas de malta con aroma de limón, naranja, lima o frutas del bosque, bebidas de malta con aroma de licor, por ejemplo, licor de malta con aroma de vodka, ron o tequila, o bebidas de malta con aroma de café, tal como licor

de malta con aroma de cafeína, y similares. El término “bebidas” o “producto de bebidas” también incluye cerveza elaborada con materiales alternativos distintos de la cebada malteada, tal como centeno, maíz, avena, arroz, mijo, triticale, yuca, sorgo, cebada, trigo y una combinación de los mismos. El término “bebidas” o “producto de bebidas” también incluye otros productos fermentados tales como vino o sidras o perada o sake.

Se denomina cerveza tradicionalmente a una bebida alcohólica derivada de malta, tal como malta derivada de grano de cebada, y opcionalmente un complemento, tal como material vegetal que contiene almidón (por ejemplo, granos de cereal) y opcionalmente aromatizada, por ejemplo, con lúpulos. En el contexto de la presente invención, el término “cerveza” incluye cualquier mosto fermentado, producido mediante la fermentación/elaboración para cerveza de un material vegetal que contiene almidón, por tanto en particular también cerveza producida exclusivamente a partir de complemento, o cualquier combinación de malta y complemento. La cerveza puede elaborarse a partir de una variedad de material vegetal que contiene almidón mediante esencialmente el mismo proceso, consistiendo el almidón principalmente en homopolímeros de glucosa en los que los residuos de glucosa están unidos mediante enlaces alfa-1,4 o alfa-1,6, predominando los primeros. La cerveza puede elaborarse a partir de materiales alternativos tales como centeno, maíz, avena, arroz, mijo, triticale, yuca, sorgo, trigo, cebada y una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un medio de fermentación (por ejemplo, fermentación de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake) que comprende una enzima ALDC e ion metálico a una concentración de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 200 mM, tal como de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 500 μM , o de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 50 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 25 μM . En algunas realizaciones, la invención proporciona un medio de fermentación (por ejemplo, fermentación de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake) que comprende una enzima ALDC e ion metálico a una concentración de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 100 mM, tal como de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 10 μM , o de 1 μM a aproximadamente 100 mM, o de 1 μM a aproximadamente 10 μM , o de 6 μM a aproximadamente 10 μM , o de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 200 μM , o de aproximadamente 50 μM a aproximadamente 1 mM, o de aproximadamente 100 μM a aproximadamente 10 mM, o de aproximadamente 100 μM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 100 μM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 100 μM a aproximadamente 200 mM, o de aproximadamente 250 μM a aproximadamente 120 mM, o de aproximadamente 500 μM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM. En algunas realizaciones, la invención proporciona un medio de fermentación (por ejemplo, fermentación de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake) que comprende una enzima ALDC e ion metálico a una concentración de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 200 mM, tal como aproximadamente de 1 μM a aproximadamente 500 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 50 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 50 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 25 μM . En algunas realizaciones, la invención proporciona un medio de fermentación (por ejemplo, fermentación de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake) que comprende una enzima ALDC e ion metálico a una concentración de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 50 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 50 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 25 μM . En algunas realizaciones, la actividad de dicha enzima ALDC está en el intervalo de 950 a 2500 unidades por mg de proteína, o de 1000 a 2500 unidades por mg de proteína, o de 1500 a 2500 unidades por mg de proteína. En algunas realizaciones, el medio de fermentación (por ejemplo, fermentación de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake) comprende además al menos una enzima o derivado de enzima adicional seleccionado del grupo que consiste en acetolactato reductoisomerasas, acetolactato isomerasas, amilasa, glucoamilasa, hemicelulasa, celulasa, glucanasa, pululanasa, isoamilasa, endo-glucanasa y enzimas accesorias hidrolíticas de beta-glucano relacionadas, xilanasas, enzimas accesorias de xilanasas (por ejemplo, arabinofuranosidasa, ácido ferúlico esterasa y xilano acetilsterasa) y proteasa.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un medio de maduración (por ejemplo, fermentación de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake) que comprende una enzima ALDC e ion metálico a una concentración de 1 μM a aproximadamente 200 mM, tal como de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 500 μM , o de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 50 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 50 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 25 μM . En algunas realizaciones, la invención proporciona un medio de maduración (por ejemplo, fermentación de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake) que comprende una enzima ALDC e ion metálico a una concentración de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 100 mM, o de 1 μM a aproximadamente 100 mM, tal como de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 10 μM , o de 1 μM a aproximadamente 10 μM , o de 6 μM a aproximadamente 10 μM , o de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 200 μM , o de aproximadamente 50 μM a aproximadamente 1 mM, o de aproximadamente 100 μM a aproximadamente 10 mM, o de aproximadamente 100 μM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 100 μM a aproximadamente 100 μM , o de aproximadamente 100 μM a aproximadamente 200 mM, o de aproximadamente 250

5 μM a aproximadamente 120 mM, o de aproximadamente 500 μM a aproximadamente 100 mM, o aproximadamente de 1 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM. En algunas realizaciones, la invención proporciona un medio de maduración (por ejemplo, fermentación de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake) que comprende una enzima ALDC e ion metálico a una concentración de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 500 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 50 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 25 μM . En algunas realizaciones, la invención proporciona un medio de maduración (por ejemplo, fermentación de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake) que comprende una enzima ALDC e ion metálico a una concentración de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 50 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 50 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 25 μM . En el medio de la invención, el ion metálico es Zn^{2+} . En algunas realizaciones, la actividad de dicha enzima ALDC está en el intervalo de 950 a 2500 unidades por mg de proteína, o de 1000 a 2500 unidades por mg de proteína, o de 1500 a 2500 unidades por mg de proteína. En algunas realizaciones, el medio de maduración (por ejemplo, maduración de cerveza y/o vino) comprende además al menos una enzima o derivado de enzima adicional seleccionado del grupo que consiste en acetolactato reductoisomerasas, acetolactato isomerasas, amilasa, glucoamilasa, hemicelulasa, celulasa, glucanasa, pululanasa, isoamilasa, endo-glucanasa y enzimas accesorias hidrolíticas de beta-glucano relacionadas, xilanasas, enzimas accesorias de xilanasas (por ejemplo, arabinofuranosidasa, ácido ferúlico esterasa y xilano acetilsterasa) y proteasa.

10 En algunas realizaciones, iones metálicos tales como Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} y Fe^{2+} y combinaciones de los mismos se añaden al medio de cultivo y/o de fermentación durante y/o después de la producción de ALDC para aumentar los rendimientos recuperados a partir de microorganismos.

15 El término "medio de cultivo" tal como se usa en el presente documento se refiere a un medio que soporta el crecimiento de microorganismos tal como una célula huésped que produce ALDC. Los ejemplos de un medio de cultivo incluyen: medio a base de tampón MOPs con, por ejemplo, urea como fuente de nitrógeno principal y maltrina como fuente de carbono principal; y caldo TSB.

20 Pueden añadirse materiales a una composición que contiene enzima para mejorar las propiedades de la composición. Los ejemplos no limitativos de tales aditivos incluyen: sales (por ejemplo, sales alcalinas, sales de metales térreos, sales de cloruro adicionales, sales de sulfato, sales de nitrato, sales de carbonato, en las que los contraiones a modo de ejemplo son calcio, potasio y sodio), minerales inorgánicos o arcillas (por ejemplo, zeolitas, caolín, bentonita, talcos y/o silicatos), carbohidratos (por ejemplo, sacarosa y/o almidón), pigmentos de coloración (por ejemplo, dióxido de titanio), biocidas (por ejemplo, Rodalon[®], Proxel[®]), dispersantes, agentes antiespumantes, agentes reductores, agentes ácidos, agentes alcalinos, estabilizadores enzimáticos (por ejemplo, poliol tal como glicerol, propilenglicol, sorbitol, sales inorgánicas, azúcares, azúcar o un alcohol sacárico, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico y combinaciones de los mismos), inhibidores enzimáticos, conservante (por ejemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato, sorbato u otros conservantes aprobados para alimentos) y combinaciones de los mismos. Los excipientes que pueden usarse en la composición, o la preparación de la misma, incluyen maltosa, sirope de maltosa, sacarosa, glucosa (incluyendo sirope de glucosa o sirope de glucosa secado), almidón precocinado, almidón gelatinizado, L-láctico, palmitato de ascorbilo, tocoferoles, lecitinas, ácido cítrico, citratos, fosfórico, fosfatos, almidón de sodio, carragenano, goma garrofín, goma guar, goma xantana, pectinas, carboximetilcelulosa sódica, mono- y diglicéridos, ésteres de ácido cítrico de mono- y diglicéridos, ésteres de sacarosa, dióxido de carbono, argón, helio, nitrógeno, óxido nítrico, oxígeno, hidrógeno y octenilsuccinato sódico de almidón.

Métodos

25 En algunos aspectos, la invención proporciona métodos para mejorar la estabilidad y/o actividad de enzimas ALDC.

30 En algunas realizaciones, la descripción proporciona métodos para aumentar la actividad y/o estabilidad de una enzima ALDC en una composición que comprende ALDC, comprendiendo dicho método la etapa de añadir un ion metálico a la composición de modo que dicho ion metálico esté presente en dicha composición a una concentración de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 200 mM, tal como de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 500 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 50 μM , o de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 150 mM, o de aproximadamente 20 μM a aproximadamente 120 mM, o de aproximadamente 25 μM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 25 μM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 25 μM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 25 μM a aproximadamente 50 μM , o de aproximadamente 100 μM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 250 μM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 500 μM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM. En los métodos de la invención, el ion metálico es Zn^{2+} .

En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para aumentar la actividad y/o estabilidad de una enzima ALDC en un medio de fermentación y/o maduración que comprende una enzima ALDC, comprendiendo dicho método la etapa de añadir cinc al medio de modo que dicho cinc esté presente en dicho medio a una concentración de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 300 μM , tal como de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 300 μM , de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 μM , de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 50 μM , de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 25 μM o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 25 μM . En algunas realizaciones, los métodos para aumentar la actividad y/o estabilidad de una enzima ALDC comprenden añadir un cinc a un medio de modo que el cinc esté a una concentración de aproximadamente 25 μM a aproximadamente 150 μM en el medio. En algunas realizaciones, los métodos para aumentar la actividad y/o estabilidad de una enzima ALDC comprenden añadir cinc a una concentración de aproximadamente 100 μM a aproximadamente 20 mM. En algunas realizaciones, los métodos para aumentar la actividad y/o estabilidad de una enzima ALDC comprenden añadir cinc a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM. En algunas realizaciones, los métodos para aumentar la actividad y/o estabilidad de una enzima ALDC comprenden añadir cinc a una relación molar de cinc con respecto a enzima ALDC que es mayor de 1 tal como 2:1, o 3:1, o 5:1, o 10:1, o 20:1 o 30:1, o 50:1, o 60:1, o 100:1, o 150:1, o 200:1 o 250:1 en dicha composición. En algunas realizaciones, los métodos para aumentar la actividad y/o estabilidad de una enzima ALDC comprenden añadir cinc a una relación molar de cinc con respecto a enzima ALDC de 5:1 o mayor en dicha composición. En algunas realizaciones, los métodos para aumentar la actividad y/o estabilidad de una enzima ALDC comprenden añadir cinc a una relación molar de cinc con respecto a enzima ALDC de 10:1 o mayor en dicha composición. En algunas realizaciones, los métodos para aumentar la actividad y/o estabilidad de una enzima ALDC comprenden añadir cinc a una relación molar de cinc con respecto a enzima ALDC de 20:1 o mayor en dicha composición. En algunas realizaciones, los métodos para aumentar la actividad y/o estabilidad de una enzima ALDC comprenden añadir cinc a una relación molar de cinc con respecto a enzima ALDC de 30:1 o mayor en dicha composición. En algunas realizaciones, el ion metálico se añade (por ejemplo, como suplemento) a un medio de cultivo durante la producción de dicha enzima ALDC mediante una célula huésped que produce ALDC. En algunas realizaciones, el ion metálico se añade a una concentración de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 1 mM, tal como de aproximadamente 25 μM a aproximadamente 150 μM , o de aproximadamente 40 μM a aproximadamente 150 μM , o de aproximadamente 60 μM a aproximadamente 150 μM , o de aproximadamente 25 μM a aproximadamente 50 μM , o de 30 μM a aproximadamente 40 μM . En los métodos de la invención, el ion metálico es Zn^{2+} . Por tanto, en algunas realizaciones se añade cinc (por ejemplo, como suplemento) a un medio de cultivo durante la producción de dicha enzima ALDC mediante una célula huésped que produce ALDC a una concentración de 1 μM a aproximadamente 1 mM, tal como de 25 μM a aproximadamente 150 μM , o de aproximadamente 40 μM a aproximadamente 150 μM , o de 60 μM a aproximadamente 150 μM .

En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula huésped de *Bacillus*. En algunas realizaciones, la célula huésped de *Bacillus* es *Bacillus subtilis*.

El ion metálico se añade en el medio de fermentación durante la fermentación de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake. En los métodos de la invención, el ion metálico es Zn^{2+} . Por tanto, se añade cinc en un medio de fermentación durante la fermentación de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake. En algunas realizaciones, el cinc se añade a una concentración de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 μM , o de 25 μM a aproximadamente 50 μM , o de 30 μM a aproximadamente 40 μM , o de 1 μM a aproximadamente 50 μM , o de 6 μM a aproximadamente 50 μM , o de 1 μM a aproximadamente 25 μM , o de 6 μM a aproximadamente 25 μM . En algunas realizaciones, el cinc y la enzima ALDC se añaden en una composición, siendo la relación molar de cinc con respecto a enzima ALDC en la composición mayor de 1, tal como 2:1, o 3:1, o 5:1, o 10:1, o 20:1 o 30:1, o 50:1, o 60:1.

El ion metálico se añade en el medio de maduración durante la fermentación de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake. En los métodos de la invención, el ion metálico es Zn^{2+} . Por tanto, se añade cinc en un medio de maduración durante la fermentación de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake. En algunas realizaciones, el cinc se añade a una concentración de 1 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 6 μM a aproximadamente 300 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 μM , o de 25 μM a aproximadamente 50 μM , o de 30 μM a aproximadamente 40 μM , o de 1 μM a aproximadamente 50 μM , o de 6 μM a aproximadamente 50 μM , o de 1 μM a aproximadamente 25 μM , o de 6 μM a aproximadamente 25 μM . En algunas realizaciones, el cinc y la enzima ALDC se añaden en una composición, siendo la relación molar de cinc con respecto a enzima ALDC en la composición mayor de 1, tal como 2:1, o 3:1, o 5:1, o 10:1, o 20:1 o 30:1, o 50:1, o 60:1.

Productos fermentados

Tal como se usa en el presente documento, un producto alcohólico fermentado con "bajo contenido de diacetilo" se refiere a un producto alcohólico fermentado (por ejemplo, una cerveza y/o un vino y/o una sidra y/o una perada y/o sake) producido mediante la fermentación de un sustrato que contiene carbohidratos con una composición que comprende ALDC en presencia de un ion metálico (tal como cinc) en el que los niveles de diacetilo son menores en comparación con el alcohólico fermentado producido mediante la fermentación de un sustrato que contiene carbohidratos con una composición que comprende ALDC en ausencia de un ion metálico (tal como cinc) en las mismas condiciones de fermentación (por ejemplo, misma temperatura y durante la misma duración de tiempo). Ejemplos de productos alcohólicos fermentados con bajo contenido de diacetilo son productos alcohólicos fermentados

en los que los niveles de diacetilo son menos de aproximadamente 1 ppm y/o los niveles de diacetilo están por debajo de aproximadamente 0,5 mg/l. De manera adecuada, los niveles de diacetilo son menos de aproximadamente 0,5 ppm, o menos de aproximadamente 0,1 ppm, o menos de aproximadamente 0,05 ppm, o menos de aproximadamente 0,01 ppm, o menos de aproximadamente 0,001 ppm. En una realización, los niveles de diacetilo son aproximadamente menos de 0,1 mg/l, o aproximadamente menos de 0,05 mg/l, o aproximadamente menos de 0,01 mg/l o aproximadamente menos de 0,001 mg/l.

Cuando sustratos que contienen carbohidratos, tales como mosto (por ejemplo, mostos con un bajo contenido de malta) o zumos de fruta (tales como zumo de uva, zumo de manzana o zumo de pera), se fermentan con levadura u otros microorganismos, tienen lugar diversos procesos además de la fermentación de alcohol que pueden provocar la generación de subproductos no deseados, por ejemplo, la formación de diacetilo que tiene un olor fuerte y desagradable incluso en concentraciones muy bajas. Por tanto, las bebidas alcohólicas, tales como cerveza o vino o sidra o perada o sake, pueden tener un aroma y sabor inaceptables si el contenido de diacetilo supera considerablemente ciertos límites, por ejemplo, en el caso de algunas cervezas aproximadamente 0,1 ppm.

La formación de diacetilo también es desventajosa en la producción industrial de etanol porque es difícil separar el diacetilo del etanol mediante destilación. Un problema particular surge en la preparación de etanol absoluto, en la que el etanol se deshidrata mediante destilación azeotrópica con benceno. El diacetilo se acumulará en la fase de benceno durante la destilación azeotrópica, lo que puede dar lugar a mezclas de diacetilo y benceno, lo que hace difícil recuperar el benceno usado para la destilación azeotrópica.

La elaboración convencional de cerveza comprende fermentar el mosto con una especie adecuada de levadura, tal como *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces carlsbergensis*.

Normalmente en la elaboración de cerveza convencional, la fermentación se efectúa habitualmente en dos etapas, una fermentación principal de una duración de normalmente 5 a 12 días y una fermentación secundaria - un denominado proceso de maduración - que puede durar hasta 12 semanas. Durante la fermentación principal, la mayoría de los carbohidratos en el mosto se convierten en etanol y dióxido de carbono. La maduración se efectúa habitualmente a baja temperatura en presencia de una pequeña cantidad residual de levadura. Los propósitos de la maduración son, entre otros, precipitar compuestos de alto peso molecular, no deseables, y convertir los compuestos no deseables en compuestos, tales como dioles, que no afectan al sabor ni al aroma. Por ejemplo, butanodiol, el producto final de la conversión de α -acetolactato y diacetilo en cerveza, se notifica normalmente como un compuesto con características sensoriales neutras. El término "medio de fermentación" tal como se usa en el presente documento se refiere a un medio que comprende sustratos que contienen carbohidratos que pueden fermentarse mediante levadura u otros microorganismos para producir, por ejemplo, cerveza o vino o sidra o perada o sake. Los ejemplos de medio de fermentación incluyen: mosto, y zumos de fruta (tal como zumo de uva, zumo de manzana y zumo de pera). El ejemplo 9 detalla un ejemplo de mosto adecuado. El término "medio de maduración" tal como se usa en el presente documento se refiere a un medio que comprende sustratos que contienen carbohidratos que se han fermentado mediante levadura u otros microorganismos para producir, por ejemplo, cerveza o vino o sidra o perada o sake. Los ejemplos de medio de maduración incluyen mosto y zumos de fruta parcialmente fermentados (tal como zumo de uva, zumo de manzana y zumo de pera). En algunas realizaciones, la invención proporciona un medio de fermentación o maduración para una célula huésped que produce ALDC que comprende un ion metálico a una concentración de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 300 μ M. En algunas realizaciones, la invención proporciona un medio de fermentación o maduración para una célula huésped que produce ALDC que comprende un ion metálico a una concentración de aproximadamente 6 μ M a aproximadamente 25 μ M.

Por tanto, en algunas realizaciones, los métodos de la invención están caracterizados por el tratamiento de un sustrato con una composición que comprende ALDC o un derivado de ALDC tal como se describe en el presente documento durante o a continuación de un proceso de fermentación, por ejemplo, maduración.

Por tanto, en algunas realizaciones, el acetolactato se descarboxila enzimáticamente para dar acetoína, siendo el resultado que, cuando no sea deseable, se evita la formación de diacetilo a partir de acetolactato. En algunas realizaciones, se usan otras enzimas en combinación con ALDC para la conversión de α -acetolactato. Los ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan a, acetolactato reductoisomerasas o isomerasas.

En algunas realizaciones, las composiciones de ALDC y/o de derivado de ALDC descritas en el presente documento se usan junto con levadura ordinaria en fermentación por lotes.

En lugar de usar la enzima en un estado libre, puede usarse en un estado inmovilizado, añadiéndose la enzima inmovilizada al mosto durante o a continuación de la fermentación (por ejemplo, durante la maduración). La enzima inmovilizada también puede mantenerse en una columna a través de la que se hace pasar el mosto en fermentación o la cerveza. La enzima puede inmovilizarse por separado, o pueden usarse células de levadura y acetolactato descarboxilasa inmovilizadas conjuntamente.

En algunas realizaciones, las composiciones de ALDC y/o de derivado de ALDC descritas en el presente documento se usan durante la fermentación o maduración de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake para reducir los

niveles de diacetilo hasta por debajo de aproximadamente 1 ppm, o aproximadamente menos de 0,5 ppm, o aproximadamente menos de 0,1 ppm, o aproximadamente menos de 0,05 ppm o aproximadamente menos de 0,01 ppm, o aproximadamente menos de 0,001 ppm. En algunas realizaciones, las composiciones de ALDC y/o derivado de ALDC descritas en el presente documento se usan durante la fermentación o maduración de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake para reducir los niveles de diacetilo hasta por debajo de 0,1 ppm.

En algunas realizaciones, las composiciones de ALDC y/o de derivado de ALDC descritas en el presente documento se usan durante la fermentación o maduración de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake para reducir el contenido de VDK por debajo de 0,1 mg/l, o aproximadamente menos de 0,05 mg/l, o menos de 0,01 mg/l o menos de 0,001 mg/l. VDK totales se refiere a la cantidad de diacetilo más 2,3-pentanodiona. En algunas realizaciones, las composiciones de ALDC y/o de derivado de ALDC descritas en el presente documento se usan durante la fermentación o maduración de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake para reducir el contenido de VDK total por debajo de 0,1 mg/l.

En algunas realizaciones, las composiciones de ALDC y/o de derivado de ALDC descritas en el presente documento se usan durante la fermentación o maduración de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake para reducir los niveles de diacetilo hasta por debajo de aproximadamente 0,5 mg/l, o aproximadamente menos de 0,1 mg/l, o aproximadamente menos de 0,05 mg/l, o aproximadamente menos de 0,01 mg/l o aproximadamente menos de 0,001 mg/l. En algunas realizaciones, las composiciones de ALDC y/o de derivado de ALDC descritas en el presente documento se usan durante la fermentación o maduración de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake para reducir los niveles de diacetilo hasta por debajo de 0,1 mg/l.

En algunas realizaciones, las composiciones de ALDC y/o de derivado de ALDC descritas en el presente documento se usan durante la fermentación o maduración de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake para reducir otras dicetonas vecinales (tal como 2,3-pentanodiona) hasta por debajo de 0,1 mg/l, o aproximadamente menos de 0,05 mg/l, o menos de 0,01 mg/l o menos de 0,001 mg/l.

Los procesos de la invención pueden usarse no solo en relación con la elaboración de cerveza, sino que también es adecuado para la producción de cualquier bebida alcohólica adecuada en la que sea deseable una reducción en los niveles de diacetilo u otras dicetonas vecinales (por ejemplo, vino, sake, sidra, perada, etc.). En algunas realizaciones, los procesos de la invención pueden usarse en la producción de vino en la que se obtienen ventajas similares, en particular una reducción en el periodo de maduración y una simplificación del proceso. De especial interés en este contexto es el uso de enzimas convertidoras de acetolactato en relación con la denominada fermentación malo-láctica. Este proceso que se ve afectado por microorganismos como especies de *Leuconostoc*, *Lactobacillus* o *Pediococcus* se lleva a cabo tras la fermentación principal del vino con el fin de aumentar el pH del producto así como su estabilidad biológica y desarrollar el aroma del vino. Además, es altamente deseable llevar a cabo la fermentación dado que hace posible un embotellamiento rápido y de ese modo mejora el flujo de caja de las bodegas sustancialmente. Desafortunadamente, sin embargo, el proceso puede dar lugar a aromas extraños debido al diacetilo, cuya formación puede reducirse con la ayuda de enzimas convertidoras de acetolactato.

Por tanto, en algunas realizaciones, los procesos de la invención proporcionan la producción de bebidas alcohólicas con bajo contenido de diacetilo, en la que el tiempo requerido para producir las bebidas alcohólicas con bajo contenido de diacetilo se reduce en al menos el 10%, o al menos el 20% o al menos el 30%, o al menos el 40%, o al menos el 50%, o al menos el 60%, o al menos el 70%, o al menos el 80%, o al menos el 90% en comparación con un proceso sin el uso de las composiciones de ALDC y/o de derivado de ALDC descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, los procesos de la invención proporcionan la producción de bebidas alcohólicas con bajo contenido de diacetilo en comparación con un proceso sin el uso de las composiciones de ALDC y/o de derivado de ALDC descritas en el presente documento, en la que se elimina completamente una etapa de maduración.

En algunas realizaciones, las composiciones de ALDC y/o de derivado de ALDC descritas en el presente documento se usan durante un proceso de fermentación (por ejemplo, fermentación de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake), de modo que el tiempo requerido para el proceso de fermentación se reduce en al menos el 10%, o al menos el 20% o al menos el 30%, o al menos el 40%, o al menos el 50%, o al menos el 60%, o al menos el 70%, o al menos el 80%, o al menos el 90%, en comparación con un proceso sin el uso de las composiciones de ALDC y/o de derivado de ALDC descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, los procesos de la invención proporcionan la producción de bebidas alcohólicas con bajo contenido de diacetilo en comparación con un proceso sin el uso de las composiciones de ALDC y/o de derivado de ALDC descritas en el presente documento, en la que se elimina completamente una etapa de maduración.

En algunas realizaciones, las composiciones de ALDC y/o de derivado de ALDC descritas en el presente documento se usan durante un proceso de maduración o acondicionamiento (por ejemplo, maduración/acondicionamiento de cerveza), de modo que el tiempo requerido para el proceso de maduración o acondicionamiento se reduce en al menos el 10%, o al menos el 20% o al menos el 30%, o al menos el 40%, o al menos el 50%, o al menos el 60%, o al menos el 70%, o al menos el 80%, o al menos el 90%, en comparación con un proceso sin el uso de las composiciones de ALDC y/o de derivado de ALDC descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, los procesos de la invención proporcionan la producción de bebidas alcohólicas con bajo contenido de diacetilo en comparación con un

proceso sin el uso de las composiciones de ALDC y/o de derivado de ALDC descritas en el presente documento, en la que se elimina completamente una etapa de maduración.

Además, en algunas realizaciones, los procesos descritos en el presente documento pueden usarse ventajosamente para la preparación industrial de etanol ya que se obtienen productos de fermentación sin o prácticamente sin ningún contenido de diacetilo, lo que simplifica el proceso de destilación, especialmente en el caso de azeotrópica para la preparación de etanol absoluto, es decir etanol anhidro puro.

En algunas realizaciones, la enzima ALDC y dicho cinc se añaden durante un proceso de fermentación y/o un proceso de maduración. En algunas realizaciones, la enzima ALDC se añade a una concentración de aproximadamente 0,01 g a aproximadamente 10 g, o de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 10 g, o de aproximadamente 1 g a aproximadamente 5 g por hectolitro de fermento de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake. Tal como se usa en el presente documento, el término "fermento de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake" puede ser intercambiable con el término medio. En algunas realizaciones, la actividad de dicha enzima ALDC está en el intervalo de 1000 a 2500 unidades por mg de proteína.

Producción de enzimas ALDC

En un aspecto adicional, la célula huésped es una célula fúngica. En aún un aspecto adicional, la célula fúngica es del género *Trichoderma*. En aún un aspecto adicional, la célula fúngica es de la especie *Trichoderma reesei* o de la especie *Hypocrea jecorina*. En otro aspecto, la célula huésped comprende, preferiblemente se transforma con, un plásmido o un vector de expresión tal como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula huésped bacteriana tal como *Bacillus*. En algunas realizaciones, la enzima ALDC se produce mediante el cultivo de una cepa de *Bacillus subtilis* que contiene un gen que codifica y expresa una enzima ALDC (por ejemplo, ALDC de *Bacillus brevis*). Ejemplos de tales células huésped y el cultivo de las mismas se describen en el documento DK149335B.

Ejemplos de vectores de expresión y/o integración adecuados se proporcionan en Sambrook *et al.* (1989) citado anteriormente, y Ausubel (1987) citado anteriormente, y van den Hondel *et al.* (1991) en Bennett and Lasure (Eds.) More Gene Manipulations In Fungi, Academic Press págs. 396-428 y la patente estadounidense n.º 5.874.276. También se hace referencia al Fungal Genetics Stock Center Catalogue of Strains (FGSC, <http://www.fgsc.net>) para una lista de vectores. Los vectores particularmente útiles incluyen vectores obtenidos de, por ejemplo, Invitrogen y Promega. Los plásmidos adecuados para su uso en células bacterianas incluyen pBR322 y pUC19 que permiten la replicación en *E. coli* y pE194, por ejemplo, que permite la replicación en *Bacillus*. Otros vectores específicos adecuados para su uso en células huésped de *E. coli* incluyen vectores tales como pFB6, pBR322, pUC18, pUC100, pDONR™201, 10 pDONR™221, pENTR™, pGEM®3Z y pGEM®4Z.

Los vectores específicos adecuados para su uso en células fúngicas incluyen pRAX, un vector de expresión de propósito general útil en *Aspergillus*, pRAX con un promotor *glaA*, y en *Hypocrea/Trichoderma* incluye pTrex3g con un promotor *cbh1*.

En algunas realizaciones, las células huésped son células fúngicas y opcionalmente células huésped fúngicas filamentosas. El término "hongos filamentosos" se refiere a todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycotina* (véase, Alexopoulos, C. J. (1962), *Introductory Mycology*, Wiley, Nueva York). Estos hongos están caracterizados por un micelio vegetativo con una pared celular compuesta de quitina, celulosa y otros polisacáridos complejos. Los hongos filamentosos de la presente divulgación son morfológica, fisiológica y genéticamente distintos de las levaduras. El crecimiento vegetativo mediante hongos filamentosos es mediante alargamiento de hifas y el catabolismo de carbono es aeróbico obligatorio. En la presente divulgación, la célula parental fúngica filamentososa puede ser una célula de una especie de, pero no se limita a, *Trichoderma* (por ejemplo, *Trichoderma reesei*, el morfo asexual de *Hypocrea jecorina*, clasificado previamente como *T. longibrachiatum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma harzianum*) (Sheir-Neirs *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20:46-53 (1984); ATCC n.º 56765 y ATCC n.º 26921), *Penicillium sp.*, *Humicola sp.* (por ejemplo, *H. insolens*, *H. lanuginosa* y *H. grisea*), *Chrysosporium sp.* (por ejemplo, *C. lucknowense*), *Gliocladium sp.*, *Aspergillus sp.* (por ejemplo, *A. oryzae*, *A. niger*, *A. sojae*, *A. japonicus*, *A. nidulans* y *A. awamori*) (Ward *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:738-743 (1993) y Goedegebuur *et al.*, *Curr. Genet.* 41:89-98 (2002)), *Fusarium sp.* (por ejemplo, *F. roseum*, *F. gramineum*, *F. cerealis*, *F. oxysporum* y *F. venenatum*), *Neurospora sp.*, (*N. crassa*), *Hypocrea sp.*, *Mucor sp.* (*M. miehei*), *Rhizopus sp.* y *Emericella sp.* (véase también, Innis *et al.*, *Science* 228:21-26 (1985)). El término "*Trichoderma*" o "*Trichoderma sp.*" o "*Trichoderma spp.*" se refieren a cualquier género fúngico clasificado previa o actualmente como *Trichoderma*.

En algunas realizaciones, las células huésped serán células bacterianas gram-positivas. Los ejemplos no limitativos incluyen cepas de *Streptomyces* (por ejemplo, *S. lividans*, *S. coelicolor* y *S. griseus*) y *Bacillus*. Tal como se usa en el presente documento, "el género *Bacillus*" incluye todas las especies dentro del género "*Bacillus*", tal como se conoce por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus* y *B. thuringiensis*. Se reconoce que el género *Bacillus* continúa experimentando reorganización

taxonómica. Por tanto, se pretende que el género incluya especies que se han reclasificado, incluyendo, pero sin limitarse a, organismos tales como *B. stearothersophilus*, que ahora se denomina "*Geobacillus tearothersophilus*."

En algunas realizaciones, la célula huésped es una cepa bacteriana gram-negativa, tal como *E. coli* o *Pseudomonas sp.* En otras realizaciones, las células huésped pueden ser células de levadura tales como *Saccharomyces sp.*, *Schizosaccharomyces sp.*, *Pichia sp.* o *Candida sp.* En otras realizaciones, la célula huésped será una célula huésped modificada mediante ingeniería genética en la que se han inactivado genes nativos, por ejemplo, mediante delección en células bacterianas o fúngicas. Cuando se desee obtener una célula huésped fúngica que tenga uno o más genes inactivados, pueden usarse métodos conocidos (por ejemplo, los métodos dados a conocer en la patente estadounidense n.º 5.246.853, la patente estadounidense n.º 5.475.101 y el documento WO 92/06209). La inactivación génica puede llevarse a cabo mediante delección completa o parcial, mediante inactivación insercional o mediante cualquier otro medio que convierta un gen en no funcional para su propósito previsto (de modo que se impida que el gen exprese una proteína funcional). En algunas realizaciones, cuando la célula huésped es una célula de *Trichoderma* y particularmente una célula huésped de *T. reesei*, los genes *cbh1*, *cbh2*, *egl1* y *egl2* estarán inactivados y/o delecionados. Células huésped de *Trichoderma reesei* a modo de ejemplo que tienen proteínas delecionadas de manera cuádruple se exponen y describen en la patente estadounidense n.º 5.847.276 y el documento WO 05/001036. En otras realizaciones, la célula huésped es una proteasa deficiente o cepa proteasa negativa. El término "proteasa deficiente" o una "cepa proteasa negativa" tal como se usa en el presente documento se refiere a una célula huésped derivada o derivable a partir de una célula parental, comprendiendo la célula huésped comprende una o más alteraciones genéticas que provocan que las células huésped produzcan una cantidad disminuida de una o más proteasas (por ejemplo, proteasas funcionales) en comparación con la célula parental; preferiblemente dicha célula huésped es deficiente en una o más proteasas seleccionadas del grupo que consiste en WprA, Vpr, Epr, lspA, Bpr, NprE, AprE, ampS, aprX, bpf, clpCP, clpEP, clpXP, codWX, lonA, lonB, nprB, map, mlpA, mpr, pepT, pepF, dppA, yqyE, tepA, yfiT, yfiG, ymfF, ypwA, yrrN, yrrO y ywaD. Se proporciona una célula huésped variante derivada de una célula parental, la célula huésped variante comprende una o más alteraciones genéticas que provocan que las células de la cepa variante produzcan una cantidad disminuida de una o más proteasas en comparación con la célula parental.

La introducción de un vector o constructo de ADN en una célula huésped incluye técnicas tales como transformación; electroporación; microinyección nuclear; transducción; transfección, (por ejemplo, transfección mediada por lipofección y mediada por DEAE-dextrina); incubación con precipitado de ADN en fosfato de calcio; bombardeo de alta velocidad con microproyectiles recubiertos con ADN; y fusión de protoplastos. Técnicas de transformación generales se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.* (1987) citado anteriormente, capítulo 9; y Sambrook *et al.* (1989) citado anteriormente, y Campbell *et al.*, Curr. Genet. 16:53-56 (1989)).

Métodos de transformación para *Bacillus* se da a conocer en numerosas referencias incluyendo Anagnostopoulos C. y J. Spizizen, J. Bacteriol. 81:741-746 (1961) y el documento WO 02/14490.

Métodos de transformación para *Aspergillus* se describen en Yelton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1470-1474 (1984); Berka *et al.*, (1991) en Applications of Enzyme Biotechnology, Eds. Kelly and Baldwin, Plenum Press (NY); Cao *et al.*, Protein Sci. 9:991-1001 (2000); Campbell *et al.*, Curr. Genet. 16:53-56 (1989) y el documento EP 238 023. La expresión de proteína heteróloga en *Trichoderma* se describe en la patente estadounidense n.º 6.022.725; la patente estadounidense n.º 6.268.328; Harkki *et al.* Enzyme Microb. Technol. 13:227-233 (1991); Harkki *et al.*, BioTechnol. 7:596-603 (1989); el documento EP 244.234; el documento EP 215.594; y Nevalainen *et al.*, "The Molecular Biology of *Trichoderma* and its Application to the Expression of Both Homologous and Heterologous Genes", en Molecular Industrial Mycology, Eds. Leong and Berka, Marcel Dekker Inc., NY (1992) págs. 129-148). También se hace referencia al documento WO96/00787 y Bajar *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8202-8212 (1991) para la transformación de cepas de *Fusarium*.

El término "célula huésped que produce ALDC" tal como se usa en el presente documento se refiere a una célula huésped capaz de expresar enzima ALDC cuando dicha célula huésped se cultiva en condiciones que permiten la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica ALDC. La secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima ALDC puede ser heteróloga u homóloga con respecto a la célula huésped. En algunas realizaciones, la célula huésped que produce ALDC es *Bacillus subtilis*. En algunas realizaciones, la célula huésped que produce ALDC es *Bacillus subtilis* que comprende un gen que codifica y expresa la enzima ALDC, comprendiendo la enzima ALDC una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% de identidad con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o cualquier fragmento funcional de las mismas. En algunas realizaciones, la célula huésped que produce ALDC es *Bacillus subtilis* que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica ALDC, teniendo dicha secuencia de ácido nucleico que codifica ALDC al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% de identidad con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o cualquier fragmento funcional de las mismas. En algunas realizaciones, la célula huésped que produce ALDC es *Bacillus subtilis* que comprende un gen que codifica ALDC derivada de *Bacillus brevis*.

EJEMPLOS

La presente divulgación se describe en más detalle en los siguientes ejemplos, que no pretenden de modo alguno limitar el alcance de la divulgación reivindicada. Las figuras adjuntas pretenden considerarse partes integrales de la memoria descriptiva y la descripción de la divulgación. Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitar, la divulgación reivindicada.

5

Ejemplo 1 - Expresión heteróloga de acetolactato descarboxilasa, aldB

10

El gen *aldB* de acetolactato descarboxilasas (ALDC) de *Brevibacillus brevis* (que puede denominarse *Bacillus brevis*) se identificó previamente (Diderichsen *et al.*, J Bacteriol. (1990) 172(8): 4315), con la secuencia expuesta como UNIPROT n.º de registro P23616.1. La secuencia de este gen, *aldB*, se representa en la SEQ ID NO:1. Los nucleótidos destacados en negrita y subrayados son los nucleótidos que codifican el péptido señal.

SEQ ID NO: 1 expone la secuencia de nucleótidos del gen aldB:

15

atgaaaaaaaaatcatcacttctatcacatctctggctctcgttgcgggctgctttgactgctttgcagctacaacggctactgtac
 cagcaccacctgccaagcaggaatccaaacctgcggtgccgctaaccggcaccaaaaaatgtactgtttcaatactcaacgatcaatgca
 ctcatgcttggacagttgaaggggacttgactttgaaagacctgaagctgcgagcgatatggggcttggfaccatcaatgatctcgatgga
 gagatgattcagatgggtacaaaattctaccagatcgacagcaccggaaaattatcggagctgccagaaagtgtgaaaactccatttgcggt
 tactacacatttcgagccgaaagaaaaactacattaaccaatgtgcaagattacaatcaattaacaaaaatgcttgaggagaaattgaaaac
 aagaacgtctttatgccgtaaagctgaccggctacctttaagatggtaaaggctagaacagttccaaaacaaaccagaccttatccgcagctg
 actgaagtaacaaaaacaatccgagttgaafttaaaaatgtaagggaacctgattggcttctatagccaaattatgcagcagccctga
 atgtcccggattccatctccacttcatcacagaggataaaacaagtggcggacacgtattaatctgcaatttgacaacgcgaatctggaat
 ttctccgatccatgagttgatgtacaattgccgcacacagatgattttgccactctgatctgacacaagttactactagccaagtacaccaag
 ctgagtcagaaagaaaataa

SEQ ID NO: 6 expone un ejemplo de una secuencia de nucleótidos que codifica una acetolactato descarboxilasa - los nucleótidos destacados en negrita y subrayados son los nucleótidos que codifican el péptido señal:

20

atgaaaaaaaaatcatcacttctatcacatctctggctctcgttgcgggctgctttgactgctttgcagctacaacggctactgta
ccagcaccacctgccaagcaggaatccaaacctgtggtgccgctaaccggcaccaaaaaatgtactgtttcaatactcaacgat
caatgcactcatgcttggacagttgaaggggacttgactttgaaagacctgaagctacgaggcgatatggggcttggtaccatcaa
 tgatctcgatggagagatgattcagatgggtacaaaattctaccagatcgacagcaccggaaaattatccgagctgccagaaagtgtgaaa
 ctccatttgcggttactacacatttcgagccgaaagaaaaactacattaaccaatgtgcaagattacaatcaattaacaaaaatgcttgagga
 gaaatttgaaaacaagaacgtctttatgccgtaaagctgaccgtactttaagatggtaaaggctagaacagttccaaaacaaaccagacc
 ttatccgcagctgactgaagtaacaaaaacaatccgagttgaafttaaaaatgtaagggaacctgattggcttctatagccaaattatg
 cagcagccctgaatgtcccggattccatctccacttcatcacagaggataaaacaagtggcggacacgtattaatctgcaatttgacaacg
 cgaatctgaaatttctccgatccatgagttgatgtacaattgccgcacacagatgattttgccactctgatctgacacaagttactactagcc
 aagtacaccaagctgagtcagaaagaaaataa

25

La proenzima codificada por el gen *aldB* se representa en la SEQ ID NO: 2. En el extremo N-terminal, la proteína tiene un péptido señal con una longitud de 24 aminoácidos tal como se predice mediante SignalP-NN (Emanuelsson *et al.*, Nature Protocols (2007) 2: 953-971). Esta secuencia de péptido señal está subrayada y está en negrita en la SEQ ID NO:2. La presencia de un péptido señal indica que esta acetolactato descarboxilasa, *aldB*, es una enzima secretada. La secuencia de la cadena madura totalmente procesada, predicha, (*aldB*, 261 aminoácidos) se representa en la SEQ ID NO: 3.

30

SEQ ID NO: 2 expone la secuencia de aminoácidos del precursor de acetolactato descarboxilasa (ALDC) aldB:

MKKNITSITSLALVAGLSLTAFAATTATVPAPPAKQESKPAVAANPAPKNVLFQYSTI
 NALMLGQFEGDLTKDLKLRGDMGLGTINDLDGEMIQMGTKFYQIDSTGKLSPELV
 KTPFAVTTHFEPKEKTTLTNVQDYNQLTKMLEEKFENKNVIFYAVKLTGTFKMKVARTV
 PKQTRPYPQLTEVTKKQSEFEFKNVKGTLLIGFYTPNYAAALNVPGFHLHFITEDKTSGGH
 VLNLQFDNANLEISPIHEFDVQLPHTDDFAHSDLTQVTTSQVHQAESERK

SEQ ID NO: 7 expone un ejemplo de una secuencia de aminoácidos del precursor de acetolactato descarboxilasa (ALDC) *aldB* - la secuencia de péptido señal está subrayada y está en negrita:

5

MKKNITSITSLALVAGLSLTAFAATTATVPAPPAKQESKPVVAANPAPKNVLFQYSTI
 NALMLGQFEGDLTKDLKLRGDMGLGTINDLDGEMIQMGTKFYQIDSTGKLSPELV
 KTPFAVTTHFEPKEKTTLTNVQDYNQLTKMLEEKFENKNVIFYAVKLTGTFKMKVARTV
 PKQTRPYPQLTEVTKKQSEFEFKNVKGTLLIGFYTPNYAAALNVPGFHLHFITEDKTSGGH
 VLNLQFDNANLEISPIHEFDVQLPHTDDFAHSDLTQVTTSQVHQAESERK

SEQ ID NO: 3 expone la secuencia de aminoácidos predicha de la acetolactato descarboxilasa (ALDC) *aldB* (261 aminoácidos):

10

ATTATVPAPPAKQESKPAVAANPAPKNVLFQYSTINALMLGQFEGDLTKDLKLRGDM
 GLGTINDLDGEMIQMGTKFYQIDSTGKLSPELVKTPFAVTTHFEPKEKTTLTNVQDYN
 QLTKMLEEKFENKNVIFYAVKLTGTFKMKVARTVPKQTRPYPQLTEVTKKQSEFEFKNV
 KGTLLIGFYTPNYAAALNVPGFHLHFITEDKTSGGHVLNLQFDNANLEISPIHEFDVQLPHT
 DDFAHSDLTQVTTSQVHQAESERK

SEQ ID NO: 8 expone un ejemplo de la secuencia de aminoácidos predicha de la acetolactato descarboxilasa (ALDC) *aldB* (261 aminoácidos):

15

ATTATVPAPPAKQESKPVVAANPAPKNVLFQYSTINALMLGQFEGDLTKDLKLRGDM
 GLGTINDLDGEMIQMGTKFYQIDSTGKLSPELVKTPFAVTTHFEPKEKTTLTNVQDYN
 QLTKMLEEKFENKNVIFYAVKLTGTFKMKVARTVPKQTRPYPQLTEVTKKQSEFEFKNV
 KGTLLIGFYTPNYAAALNVPGFHLHFITEDKTSGGHVLNLQFDNANLEISPIHEFDVQLPHT
 DDFAHSDLTQVTTSQVHQAESERK

20

El gen *aldB* de la cepa *Brevibacillus brevis* que codifica una enzima acetolactato descarboxilasa (ALDC) se produjo en *B. subtilis* usando un casete de expresión integrado que consiste en el promotor *aprE* de *B. subtilis*, la secuencia de péptido señal *aprE* de *B. subtilis*, la *aldB* madura y un terminador BPN'. Este casete se clonó en la orientación de cabeza a cabeza con respecto al casete de expresión y al casete de expresión *aldB* introducido en *B. subtilis* mediante recombinación homóloga.

25

Un mapa del vector que contiene el gen *aldB* (RIHI-*aldB*) se muestra en la Figura 1.

La secuencia madura de nucleótidos del gen *aldB* en el plásmido RIHI-*aldB* se representa en la SEQ ID NO:4.

gctacaacggctactgtaccagcaccacctgccaagcaggaatccaacctgcggttccgctaaccggcaccacaaaaatgtactgtttc
 aatactcaacgatcaatgcactcatgcttgacagtttgaaggggacttgacttgaagacctgaagctgcgaggcgatatgggcttgta
 ccatcaatgatctcggatggagagatgattcagatgggtacaaaatctaccagatcgacagcaccgaaaatattcgagctgccagaaagt
 gtgaaaactccatttgcggttactacacatttcgagccgaaagaaaaactacattaaccaatgtgcaagattacaatcaattaaacaaaatgc
 ttgaggagaaatttgaaaacaagaacgtctttatgccgtaaaactgaccggtacttttaagatggtaaaggctagaacagttccaaaacaaa
 ccagaccttatccgacgtgactgaagtaacaaaaaacatccgagtttgaatttaaaaatgtaagggaacctgattgcttctatacggc
 aaattatgcagcagccctgaatgttcccgtatccatctccactcatcacagagataaaaacaagtggcggacacgtatataatctgcaattt
 gacaacgcgaatctggaatttctccgatccatgagttgatgttcaattgccgcacacagatgattttgccactctgatctgacacaagtact
 actagccaagtacaccaagctgagtcagaagaaaa

30

La secuencia de aminoácidos de la proteína precursora aldB expresada a partir del plásmido RIHI-aldB se representa en la SEQ ID NO:5.

vrskklwisllfaltlftmafsnmsaqaATTATVPAPPAKQESKPAVAANPAPKNVLFQYSTINALML
 GQFEGDLTLKDLKLRGDMGLGTINDLDGEMIQMGTKFYQIDSTGKLSLPESVKTPFAV
 TTHFEPKEKTTLTNVQDYNQLTKMLEEKFENKNVFYAVKLTGTFKMVKARTVPKQTRP
 YPQLTEVTKKQSEFEFKNVKGTLIGFYTPNYAAALNVPGFHLHFITEDKTSGGHVLNLQF
 DNANLEISPIHEFDVQLPHTDDFAHSDLTQVTTSQVHQAESERK

La secuencia de péptido señal está en negrita, minúscula, cursiva, en la SEQ ID NO:5.

Condiciones de cultivo a pequeña escala

Para producir aldB, se cultivó un transformante de la cepa *B. subtilis* que contenía el casete de expresión *aldB* en tubos Falcon de 15 ml durante 5 horas en TSB (caldo) con 300 ppm de beta-cloro-D-alanina (CDA), y 300 µl de este precultivo se añadieron a un matraz de 500 ml llenado con 30 ml de medio de cultivo (descrito más adelante) suplementado con 300 ppm de CDA y Zn²⁺ 50 µM. Los matraces se incubaron durante 24, 48 y 72 horas a 33°C con mezclado rotacional constante a 180 rpm. Los cultivos se recogieron mediante centrifugación a 14500 rpm durante 20 minutos en tubos cónicos. Los sobrenadantes de cultivo se usaron para la determinación de proteína y ensayos. El medio de cultivo era un medio semidefinido enriquecido basado en tampón MOPs, con urea como fuente de nitrógeno principal, maltrina como fuente de carbono principal.

Condiciones de fermentación alimentada por lotes

Para producir aldB, se cultivó un transformante de la cepa *B. subtilis* que contenía el casete de expresión *aldB* en un matraz de 250 ml que contenía 30 ml de medio complejo con 300 ppm de beta-cloro-D-alanina (CDA). El matraz se incubó durante 6 horas a 37°C con mezclado rotacional constante a 180 rpm.

El cultivo se transfirió a un fermentador agitado que contenía 7 litros de componentes de medio esterilizados tal como se describe en la tabla 1 más adelante. La temperatura se controló a 37°C; el pH se controló a 7,5 usando hidróxido de amonio como solución volumétrica alcalina; el oxígeno disuelto se mantuvo al 40% o más manteniendo un flujo de aire de 7 litros/min, una sobrepresión constante de 1 bar y ajustando la velocidad de agitación. Cuando se agotó la glucosa inicial, se inició un perfil de alimentación que alimentaba una disolución de glucosa al 60% al fermentador (la velocidad de alimentación inicial era de 20 g/h que aumentó linealmente hasta 32,8 g/h a lo largo de 7 horas y se mantuvo constante a esa velocidad hasta la terminación de la fermentación).

El tiempo de fermentación total fue de 44 horas.

Tabla 1 Fórmula de medio para la fermentación de ALDC

Componente	Conc. de fórmula (g/kg de caldo)
Harina de soja	50,0
Ácido cítrico	0,10
Sulfato de magnesio heptahidratado	2,29
Fosfato de potasio, monobásico	5,44
Sulfato ferroso, heptahidratado	0,029
Sulfato de manganeso monohidratado	0,051
Sulfato de cinc heptahidratado	0,001
Glucosa monohidratada	1,10
Agente antiespumante	3,00

Ejemplo 2 - Métodos de determinación de proteína

Determinación de proteína mediante generador de imágenes Stain Free Criterion

La proteína se cuantificó mediante gel de SDS-PAGE y densitometría usando el sistema de formación de imágenes Gel Doc™ EZ. Reactivos usados en el ensayo: tampón de muestra Laemmli concentrado (2x) (Bio-Rad, n.º de catálogo 161-0737); gel Bis-Tris al 4-12% en XT de 26 pocillos (Bio-Rad, n.º de catálogo 345-0125); marcadores de proteína

“Precision Plus Protein Standards” (Bio-Rad, n.º de catálogo 161-0363); patrón de proteína BSA (Thermo Scientific, n.º de catálogo 23208) y SimplyBlue Safestain (Invitrogen, n.º de catálogo LC 6060). El ensayo se llevó a cabo tal 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 contenía 2,7 mg de DTT. La placa se selló mediante película Microseal ‘B’ de Bio-Rad y se colocó en una máquina de PCR para calentarse hasta 70°C durante 10 minutos. Después de eso, la cámara se llenó mediante tampón de migración, se fijó el casete de gel. Entonces se cargaron 10 µl de cada muestra y patrón (0, 125-1,00 mg/ml de BSA) en el gel y se cargaron 5 µl de los marcadores. Después de eso se ejecutó la electroforesis a 200 V durante 45 min. Tras la electroforesis, el gel se aclaró 3 veces 5 min en agua, entonces se tiñó en Safestain durante la noche y finalmente limpió en agua. Entonces se transfirió el gel al generador de imágenes. Se usó 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 determinarse mediante la intensidad de las bandas y la curva de calibración. El método de cuantificación de proteína se empleó para preparar muestras de enzima acetolactato descarboxilasa aldB usadas para ensayos mostrados en ejemplos posteriores.

15 Ejemplo 3 - Método de ensayo de actividad

Ensayo espectrofotométrico de α-acetolactato descarboxilasa

La α-acetolactato descarboxilasa (ALDC) cataliza la descarboxilación de α-acetolactato para dar acetoína. El producto de reacción acetoína puede cuantificarse colorimétricamente. La acetoína mezclada con α-naftol y creatina forma un color rojo característico que absorbe a OD_{522 nm}. La actividad ALDC se calculó basándose en OD_{522 nm} y una curva de calibración de acetoína. El ensayo se llevó a cabo tal como sigue: se preparó sustrato de acetolactato 20 mM mezclando 100 µl de 2-acetoxi-2-metilacetato de etilo (Sigma, n.º de catálogo 220396) con 3,6 ml de NaOH 0,5 M a 10°C durante 10 min. Se añadieron 20 ml de MES 50 mM pH 6,0, se ajustó el pH a pH 6,0 y se ajustó el volumen a 25 ml con MES 50 mM pH 6,0. Se mezclaron 80 µl de sustrato de acetolactato 20 mM con 20 µl de muestra de enzima diluida en MES 50 mM, pH 6,0, NaCl 0,6 M, BRIJ 35 al 0,05% y BSA al 0,01%. La mezcla de sustrato/enzima se incubó a 30°C durante 10 min. Entonces se transfirieron 16 µl de la mezcla de sustrato/enzima a de 200 µl de NaOH 1 M, α-naftol al 1,0% (Sigma, n.º de catálogo 33420) y creatina al 0,1% (Sigma, n.º de catálogo C3630). La mezcla de sustrato/enzima/reactivo de color se incubó a 30°C durante 20 min y entonces se leyó la OD_{522 nm}. Una unidad de actividad ALDC se define como la cantidad de enzima que produce 1 µ mol de acetoína por minuto en las condiciones del ensayo.

Ejemplo 4 - Influencia del cinc sobre la actividad de ALDC

La presencia de Zn²⁺ durante la fermentación en matraz de agitación

Se añadió ZnSO₄ a los medios de cultivo para fermentaciones a pequeña escala tal como se describe en el ejemplo 1 a concentraciones que oscilan entre 0 mM y 800 µM. aldB. Se cultivó un transformante de *B. subtilis* que contenía el casete de expresión *aldB* en tubos Falcon de 15 ml durante 5 horas en TSB (caldo) con 300 ppm de beta-cloro-D-alanina (CDA), y se añadieron 300 µl de este precultivo a cada matraz de 500 ml llenado con 30 ml de medio de cultivo suplementado con 300 ppm de CDA y que contenían Zn²⁺ 0, 5, 25, 50, 100, 200, 400 y 800 µM. Los matraces se incubaron durante 24 y 48 horas a 33°C con mezclado rotacional constante a 180 rpm. Los cultivos se recogieron mediante centrifugación a 14500 rpm durante 20 minutos en tubos cónicos. Los sobrenadantes de cultivo se usaron para la determinación de proteína y ensayos de actividad ALDC (tabla 2 y 3). Se ve claramente que el aumento de la concentración de Zn²⁺ en los medios de fermentación aumentó la actividad ALDC total y la actividad específica de enzima aldB expresada.

Tabla 2 Actividad ALDC de muestras de fermentación aldB con niveles variables de Zn²⁺ tras 24 y 48 horas de fermentación

	Actividad ALDC		
	ZnSO ₄ en muestra	24 horas de fermentación	48 horas de fermentación
	µM	U/ml	U/ml
aldB	0	298,6	235,3
	5	371,9	354,8
	25	533,9	808,0
	50	606,4	965,3
	100	633,4	668,8
	200	617,6	629,5
	400	691,1	488,5
	800	428,1	474,0

Tabla 3 Actividad ALDC, proteína aldB y actividad específica de muestras de fermentación aldB con niveles variables de Zn²⁺ tras 48 horas de fermentación

	ZnSO ₄ en muestra	Actividad ALDC	Proteína aldB	Actividad específica
	μM	U/ml	mg/ml	U/mg
aldB	0	235,3	0,626	375,9
	5	354,8	0,736	482,1
	25	808,0	1,437	562,3
	50	965,3	1,573	609,9
	100	668,8	0,957	698,9

5

Ejemplo 5 - Modulación de la actividad específica de muestras de aldB

Respuesta a la dosis de cinc de ALDC a 50°C

10 Se añadió ZnSO₄ a la muestra de fermentación de ALDC para producir concentraciones que oscilaban entre 0 mM y 20 mM. Las muestras se mantuvieron a 50°C durante 60 min y entonces se midió la actividad tal como se describe en el ejemplo 3. En relación con una muestra sin cinc, las muestras añadidas con cinc >0,5 mM tenían una actividad >200% superior. La Figura 2 muestra los resultados.

15 Ejemplo 6 - Modulación de la actividad específica de fermento aldB

La actividad AldB se produjo tal como se describe (en el ejemplo 1) y la actividad se determinó tal como se describe (en el ejemplo 3). Una muestra de fermento AldB se diluyó en MES 50 mM pH 6,0, NaCl 0,6 M, Brij al 0,05%, BSA (albúmina sérica bovina) al 0,01% hasta aproximadamente 1000 U/ml y entonces se incubó con una concentración variable de ZnSO₄ en las siguientes etapas: 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 5, 7,5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 mM. Todas las muestras se incubaron a 4°C durante 68 horas, entonces se centrifugaron y el sobrenadante se analizó para la actividad y proteína mediante análisis de SDS-PAGE Criterion. Los resultados del análisis de SDS-PAGE se muestran en la Figura 3 y la actividad, concentración de proteína y actividad específica determinadas se facilitan en la tabla 4. Puede verse que la actividad ALDC aumenta con una concentración creciente de ZnSO₄ en la muestra hasta aproximadamente 5-10 mM, desde donde es más o menos constante con las concentraciones superiores de ZnSO₄. Se determinó que la concentración de proteína aldB en la muestra era más o menos constante en todas las muestras indicando un aumento aparente en la actividad específica desde 968 U/mg en la muestra sin ZnSO₄ hasta 2200-2400 U/mg en muestras con ZnSO₄ 5 mM o más tras la incubación.

30 *Tabla 4 Actividad ALDC, concentración de proteína aldB y actividad específica de muestra de aldB incubada con ZnSO₄ a 4°C durante 68 horas.*

	ZnSO ₄ en la muestra	Actividad ALDC	Proteína aldB	Actividad específica
	mM	U/ml	mg/ml	U/m
aldB	0	556	0,57	968
	0,25	875	0,63	1387
	0,5	949	0,63	1512
	1	1058	0,59	1792
	2	1271	0,60	2124
	5	1411	0,60	2354
	7,5	1485	0,64	2311
	10	1520	0,64	2368
	20	1492	0,64	2344
	40	1499	0,67	2239
	60	1495	0,64	2345
	80	1500	0,65	2324
	100	1607	0,64	2520
	120	1520	0,69	2209

Ejemplo 7 - Purificación de aldB

La producción de aldB en *B. subtilis* se llevó a cabo tal como se describe en el ejemplo (1). El medio de fermentación se clarificó mediante centrifugación (4000 rpm a 15 min) y filtración (VacuCap 90, 0,2 µm). La muestra se desalinizó en una columna PD10, preparada tal como se describe por el fabricante y equilibrada con Tris/HCl 20 mM, pH 8,0. El eluato se mantuvo en hilo después, antes de purificarse adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico sobre una Source 15Q XK26/15. La columna se equipó en un sistema explorador ÄKTA usado para la purificación de proteína y según el método descrito por el fabricante (GE healthcare, EE. UU. - n.º de cat. 18-1112-41).

La columna se preparó tal como se describe por el fabricante y se equilibró con Tris/HCl 20 mM, pH 8,0 (tampón A). La muestra desalinizada se aplicó a la columna a una velocidad de flujo de 5 ml/min y la columna se lavó con tampón A. Las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl 0-0,30 M en Tris/HCl 20 mM, pH 8,0 (7 ml/min, 40 min). Durante toda la ejecución, se recogieron fracciones de aproximadamente 10-20 ml.

Las fracciones de la purificación se analizaron mediante SDS-PAGE usando una minicélula Xcell y según el método descrito por el fabricante (Invitrogen, EE. UU. - n.º de cat. EI0001) usando: gel Nu-PAGE (Invitrogen, EE. UU. - n.º de cat. NP0321), tampón de migración MES (Invitrogen, EE. UU. - n.º de cat. NP0002), marcador estándar See Blue (Invitrogen, EE. UU. - n.º de cat. LC5925) y se tiñó con azul brillante Coomassie.

Se observó que aldB se unió a la columna Source 15Q y se eluía con NaCl aproximadamente 30 mM. Se recogieron fracciones de aldB, se concentraron (en un UF Vivaspín de 10 kDa) y se desalinizó en tampón HEPES 25 mM que contenía NaCl 150 mM, pH 8,0. La pureza estimada de aldB estaba por encima del 95% y el resultado del análisis de SDS-page de la aldB purificada se muestra en la figura 4.

Ejemplo 8 - Modulación de la actividad específica de aldB purificada

La proteína aldB purificada se limpió de iones divalentes mediante la incubación de aldB (aproximadamente 2 mg/ml) con EDTA 20 mM en 0,2x tampón de ensayo (MES 50 mM pH 6,0, NaCl 0,6 M, Brij al 0,05%, BSA al 0,01%) a 37°C durante la noche. El material tratado con EDTA se desalinizó en una columna PD10 preparada tal como se describe por el fabricante y equilibrada con MES 50 mM pH 6,0, NaCl 0,6 M, Brij al 0,05%, BSA al 0,01%. La actividad ALDC y la concentración de proteína AldB en la muestra antes y después del tratamiento con EDTA y la columna de desalinización se determinaron tal como se describe en el ejemplo (2 y 3) y los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5 Actividad ALDC, concentración proteína de aldB y actividad específica de aldB purificada antes y después del procedimiento de EDTA-desalinización.

	Actividad ALDC	Concentración de proteína aldB	Actividad específica
	U/ml	mg/ml	U/mg
AldB purificada	5187	5,6	928
AldB purificada - tratada con EDTA y desalinizada	9	1,0	9

Se mezclaron 50 µl de la muestra de aldB tratada con EDTA y desalinizada con 450 µl de 0,2x tampón de ensayo (MES 50 mM pH 6,0, NaCl 0,6 M, Brij al 0,05%, BSA al 0,01%) con ZnSO₄ variable en la etapa: 0, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10 y 20 mM respectivamente. Las muestras se incubaron a 37°C durante la noche. Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min y la actividad ALDC y la concentración de proteína AldB se determinaron en el sobrenadante. Los resultados se muestran en la tabla 6. Puede verse que la actividad ALDC aumenta con la concentración creciente de ZnSO₄ durante la incubación. Se determinó que la concentración de proteína aldB en la muestra era constante en todas las muestras indicando un aumento en la actividad específica desde 2 U/mg de aldB en la muestra sin ZnSO₄ hasta 1800 U/mg de aldB en muestras con ZnSO₄ 5 mM o más tras la incubación.

Tabla 6 Actividad ALDC, concentración de proteína aldB y actividad específica de aldB purificada antes y después de la incubación con ZnSO₄.

Concentración de ZnSO ₄ en 0,2X tampón de ensayo	Concentración final de ZnSO ₄	Actividad ALDC	Concentración de proteína aldB	Actividad específica
mM	mM	U/ml	mg/ml	U/mg
0	0	0,1	0,092	2
0,05	0,045	4,4	0,092	48
0,1	0,09	26,1	0,092	283
0,5	0,45	147,1	0,092	1599

Concentración de ZnSO ₄ en 0,2X tampón de ensayo	Concentración final de ZnSO ₄	Actividad ALDC	Concentración de proteína aldB	Actividad específica
mM	mM	U/ml	mg/ml	U/mg
1	0,9	157,7	0,092	1714
2	1,8	157,9	0,092	1716
5	4,5	166,4	0,092	1809
10	9	174,6	0,092	1898
20	18	173,5	0,092	1886

Además, se mezclaron 20 µl de la muestra de aldB tratada con EDTA y desalinizada con 180 µl de MES 50 mM pH 6,0 suplementado con o bien ZnSO₄, MnSO₄ o CoCl₂ 10 mM respectivamente. Las muestras se incubaron a 37°C y se sometieron a ensayo después de 45 minutos, 1 día, 2 días y 3 días. Los resultados se muestran en la tabla 7. La actividad aumento para la incubación con los tres iones divalentes en el orden Zn²⁺, Mn²⁺ y Co²⁺ en comparación con el control (adición de H₂O). Tras 45 min se mostró que la actividad disminuía a lo largo del tiempo. La adición de Zn²⁺, Mn²⁺ y Co²⁺ dio como resultado en todos los casos una estabilidad (actividad) aumentada tras 3 días en comparación con el control con adición de H₂O. La actividad residual medida tras 3 días en relación con la inicial era del 76,9%, del 73,5% y del 70,7% tras la adición de Zn²⁺, Mn²⁺ y Co²⁺ en comparación con el 56,0% obtenido con H₂O, tal como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7 Actividad ALDC tras la incubación a pH 6,0 con MnSO₄, CoCl₂ o ZnSO₄ a diversos tiempos.

	Actividad U/ml			
	H ₂ O	Mn ²⁺	Co ²⁺	Zn ²⁺
45min	21,8	217,3	101,8	319,7
1 día	18,9	219,6	90,5	288,5
2 días	22,5	216,2	95,2	295,4
3 días	12,2	153,6	74,8	245,7

15 Ejemplo 9 - Reducción en diacetilo y 2,3-pentanodiona durante la fermentación de cerveza mediante el uso de aldB con diferente actividad ALDC específica

El objetivo de este análisis era someter a prueba la capacidad de diferentes variantes de formulación de aldB (acetolactato descarboxilasa) para reducir el desarrollo de diacetilo y 2,3-pentanodiona (dicetonas vecinales, VDK) durante una fermentación de 7 días a 14°C.

Análisis de elaboración de cerveza con malta pura

Se disolvieron 1100 g de extracto Munton's Light Malt Extract (lote XB 35189, fecha de caducidad 24/05/2014) en 3000 ml de agua corriente caliente (45°C). Esta suspensión se agitó durante aproximadamente 10 min hasta que el líquido era homogéneo y el pH se ajustó a 5,2 con ácido sulfúrico 2,5 M. A la suspensión se le añadieron 10 pellets de lúpulos amargos de Hopfenveredlung, St. Johann: contenido de alfa del 16,0% (análisis de HPLC específico EBC 7.7 0, 01/10/2013), entonces se dividió en botellas de tapón azul de 500 ml y se hirvieron durante 1 hora para garantizar la precipitación de proteína y evitar una contaminación microbiana potencial. El extracto de malta filtrado (mosto) se muestreó para la determinación del peso específico y amino nitrógeno libre (FAN). El mosto final tenía un peso específico inicial de 1048 (es decir 12°Plato). Se añadieron 200 g del mosto filtrado a un matraz cónico de 500 ml (recipiente de fermentación; FV (*Fermenting Vessel*)), y entonces se enfriaron hasta 13°C. Cada matraz cónico se dosificó con levadura recién producida W34/70 al 0,5% (Weißenstephan) (1,0 g de levadura por 200 g de mosto). Las enzimas se dosificaron en actividad ALDC similar (0,03 U/ml de mosto, 8 unidades ALDC por 200 g de mosto). El recipiente de fermentación control sin enzima recibió una cantidad de agua desionizada que correspondía a la cantidad de muestra de enzima.

Las muestras de mosto se fermentaron en matraces cónicos de 500 ml en condiciones de prueba de laboratorio estandarizadas a 14°C con agitación suave a 150 rpm en un incubador orbital. Cuando la pérdida de peso era de menos de 0,25 g a lo largo de 24 horas, la temperatura de fermentación se disminuyó hasta 7°C. La fermentación se detuvo tras 7 días en total. Se tomaron muestras de 10 ml para análisis de diacetilo y 2,3-pentanodiona dos veces al día, preferiblemente con de 11 a 14 horas entremedias; al final de la fermentación solo se tomó 1 muestra por día. Se permitió que la levadura se depositase antes de la toma y cada muestra se enfrió a 10°C durante 10 minutos y entonces se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos a 8°C para sedimentar cualquier levadura residual. El sobrenadante se separó del sedimento de levadura y a las muestras para el análisis de GC se les añadieron 0,5 g de NaCl por ml de muestra. Esta suspensión se transfirió a un vial headspace y se trató con calor a 65°C durante 30 minutos antes de

que se llevara a cabo el análisis para diacetilo y 2,3-pentanodiona mediante cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas (GCMS).

5 Los análisis se llevaron a cabo en un Agilent 6890N/5973N GC con automuestreador headspace CombiPAL y software de adquisición y análisis MSChemStation. Las muestras se equilibraron a 70°C durante 10 minutos antes de inyectarse 500 µl de la fase gaseosa por encima de la muestra sobre una columna J&W 122-0763 DB-1701 (60m × 0,25mm de DI × 1 µm). La temperatura de inyección era de 260°C y el sistema se hizo funcionar con un flujo de helio constante de 2 ml/min. La temperatura de horno era: 50°C (2 min), 160°C (20°C/min), 220°C (40°C/min), espera 2 min. La detección de MS se hizo con 500 µl a una relación de división de 5:1 a iones seleccionados. Todas las muestras se ejecutaron por duplicado y se elaboraron patrones usando agua corriente con la adición de diacetilo o 2,3-pentanodiona.

La concentración de un compuesto se calcula como

$$\text{Compuesto (mg/l)} = \text{RF} \times \frac{\text{Área}}{1000 \times W_s}$$

donde,

RF es el factor de respuesta de ácido acético

Área es el área de GC de ácido acético

W_s es la cantidad de muestra usada (en ml)

25 El límite de cuantificación de diacetilo se determinó a 0,016 mg/l y el límite de cuantificación de 2,3-pentanodiona se determinó a 0,012 mg/l.

Para comprobar que la adición de enzimas ALDC no influía en el grado real de fermentación (RDF, Real Degree of Fermentation) y el alcohol producido en volumen: el RDF se midió usando un Anton Paar (DMA 5000) siguiendo la Instrucción Estándar de Elaboración de Cerveza, 23.8580-B28 y el alcohol mediante la Instrucción Estándar de Elaboración de Cerveza, 23.8580-B28.

El valor de grado real de fermentación (RDF) puede calcularse según la ecuación a continuación:

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

donde: RE = extracto real = (0,1808 × ^oP_{inicial}) + (0,8192 × ^oP_{final}), ^oP_{inicial} es el peso específico de los mostos estandarizados antes de la fermentación y ^oP_{final} es el peso específico de los mostos 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.

45 El peso específico y la concentración de alcohol se determinaron en las muestras fermentadas usando un Beer Alcolyzer Plus y un medidor de densidad DMA 5000 (ambos de Anton Paar, Gratz, Austria). Basándose en estas mediciones, el valor de grado real de fermentación (RDF) se calculó según la ecuación a continuación:

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

50 donde: E(r) es el extracto real en grados Plato (^oP) y OE es el extracto original en ^oP.

La capacidad para reducir el desarrollo de diacetilo y 2,3-pentanodiona (dicetonas vecinales, VDK) durante una fermentación de 7 días a 14°C se estudió mediante la adición de aldB con diferente actividad ALDC específica (obtenida variando la concentración de ZnSO₄ en la muestra) se facilita en la tabla 8. La variante de aldB constituye: 55 A) una preparación bruta de aldB, B) una preparación bruta de aldB que incluye ZnSO₄ 20 mM añadido al caldo clarificado y C) una preparación bruta de aldB que incluye ZnSO₄ 50 µM añadido al medio de fermentación y ZnSO₄ 20 mM a caldo clarificado.

Tabla 8 Actividad ALDC, concentración de proteína aldB y actividad específica de muestra de aldB A, B y C.

	Actividad ALDC	Proteína aldB	Actividad ALDC específica
	U/ml	mg/ml	U/mg
Variante A de aldB	426	0,463	919
Variante B de aldB	511	0,463	1103
Variante C de aldB	719	0,463	1552

5 Las variantes de enzimas se dosificaron en 0,03 U/ml de mosto de actividad ALDC similar dando como resultado una concentración diferente de proteína aldB en el mosto, como se ve en la tabla 9. La concentración de proteína aldB calculada en el mosto era de 33,4, 28,0 y 19,9 µg/l de mosto con adición de variante A, B y C respectivamente.

Tabla 9 Actividad ALDC y proteína aldB en mosto con adición de variante A, B y C de aldB.

	Actividad ALDC	Cantidad de muestra para la dilución previa	Volumen de dilución previa	Actividad en el mosto	Proteína aldB en mosto
	U/ml	g	ml	U/ml	µg/l
Variante A de aldB	426	0,721	50	0,03	33,4
Variante B de aldB	511	0,604	50	0,03	28,0
Variante C de aldB	719	0,430	50	0,03	19,9

10 Las fermentaciones se realizaron y el desarrollo de VDK se analizó tal como se describió anteriormente. Las fermentaciones se compararon con un control sin ninguna enzima añadida. El desarrollo de VDK se muestra en la figura 5.

15 Las tres variantes de aldB redujeron el desarrollo de VDK durante la fermentación en comparación con el control. Los datos sugieren que las tres variantes tuvieron un rendimiento muy similar, sin embargo con menos aumento en VDK durante el periodo de fermentación desde 20 hasta 40 horas para la variante C en comparación con A y B, pero esto está cerca de la desviación estándar relativa del análisis (RSD del 7,5%). La reducción relativa en VDK tras 40 horas de fermentación era del 63,1%, del 58,8% y del 63,2% para la variante A, B y C respectivamente. Además, el tiempo de fermentación requerido para cada nivel umbral de 0,1 mg/ml de VDK o menos, se observó que era de aproximadamente 112 horas para las tres variantes. Por tanto, la mayor actividad específica de la variante C en comparación con A o B puede posibilitar una reducción de VDK similar con menos proteína aldB.

25 **Ejemplo 10 - Reducción en diacetilo y 2,3-pentanodiona mediante aldB durante la fermentación de cerveza con diversa concentración de cinc en el mosto**

El objetivo de este análisis era someter a prueba la reducción de diacetilo y 2,3-pentanodiona (dicetonas vecinales, VDK) mediante aldB durante una fermentación de 4 días a 14°C en presencia de diverso nivel de ZnSO₄ en el mosto.

30 La configuración de análisis de elaboración de cerveza era tal como se describe en el ejemplo 9. Se elaboró una solución madre de ZnSO₄ en mosto enfriado (0,686 g en 1000 ml de mosto) y se aplicó a las muestras de mosto (preparadas tal como se describe en el ejemplo 9) antes de la fermentación, dando como resultado las siguientes concentraciones de Zn²⁺ 0, 0,1, 0,5, 0,75, 1, 2,5, 5,0 y 20,0 ppm respectivamente. Se añadieron posteriormente enzima ALDC y levadura a las muestras. Se dosificó una preparación de enzimas ALDC de manera similar a todas las muestras (0,04 U/ml de mosto, que corresponde a 8 unidades ALDC por 200 g de mosto). Cada matraz de fermentación cónico se dosificó con levadura recién producida W34/70 al 0,5% (Weihenstephan) (1,0 g de levadura por 200 g de mosto) y se llevaron a cabo análisis tal como se describe en el ejemplo 9. Las fermentaciones con enzima se compararon con un control sin ninguna enzima añadida. El desarrollo de VDK se muestra en la figura 6.

40 Todas las muestras tratadas con aldB proporcionaron menos aumento en el desarrollo de VDK durante la fermentación en comparación con el control. El aumento de la concentración de Zn²⁺ en las muestras dio como resultado menos y menor aumento de generación de VDK. Especialmente, el aumento de la concentración de Zn²⁺ hasta 0,5 ppm o más afectó enormemente a la actividad enzimática para evitar la generación de VDK. Suplementar el mosto con 1 ppm de Zn²⁺ o más garantizó un nivel de VDK por debajo del umbral de aroma de 0,1 mg/l por todo el periodo de fermentación.

45

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DuPont Nutrition Biosciences ApS Cramer, Jacob Flyvholm Jensen, Lene Bojsen Kellett-Smith, Anja Hemmingsen Bladt, Tove Lee, Sang-Kye

5 <120> Acetolactato descarboxilasa

<130> NB40736 PCT

10 <150> US62/165671
<151> 2015-05-22

<150> US62/168406
<151> 2015-05-29

15 <150> US62/166610
<151> 2015-05-26

<160> 8

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 858
<212> ADN
25 <213> *Brevibacillus brevis*

<400> 1

atgaaaaaaa	atatcatcac	ttctatcaca	tctctggctc	tggttgccgg	gctgtctttg	60
actgcttttg	cagctacaac	ggctactgta	ccagcaccac	ctgccaagca	ggaatccaaa	120
cctgcggttg	ccgctaatac	ggcaccaaaa	aatgtactgt	ttcaatactc	aacgatcaat	180
gcactcatgc	ttggacagtt	tgaaggggac	ttgactttga	aagacctgaa	gctgcgaggc	240
gatatggggc	ttggtacat	caatgatctc	gatggagaga	tgattcagat	gggtacaaaa	300
ttctaccaga	tcgacagcac	cggaaaatta	tcggagctgc	cagaaagtgt	gaaaactcca	360
tttgcggtta	ctacacattt	cgagccgaaa	gaaaaacta	cattaaccaa	tgtgcaagat	420
tacaatcaat	taacaaaaat	gcttgaggag	aaatttgaaa	acaagaacgt	cttttatgcc	480
gtaaagctga	ccggtacctt	taagatggta	aaggctagaa	cagttccaaa	acaaaccaga	540
ccttatccgc	agctgactga	agtaacaaaa	aaacaatccg	agtttgaatt	taaaaatggt	600
aagggaaacc	tgattggctt	ctatacgcca	aattatgcag	cagccctgaa	tgttcccgga	660
ttccatctcc	acttcatcac	agaggataaa	acaagtggcg	gacacgtatt	aaatctgcaa	720
tttgacaacg	cgaatctgga	aatttctccg	atccatgagt	ttgatgtaca	attgccgcac	780
acagatgatt	ttgccactc	tgatctgaca	caagttacta	ctagccaagt	acaccaagct	840
30	gagtcagaaa	gaaaataa				858

<210> 2
<211> 285
<212> PRT
35 <213> *Brevibacillus brevis*

<400> 2

ES 2 929 531 T3

Met Lys Lys Asn Ile Ile Thr Ser Ile Thr Ser Leu Ala Leu Val Ala
 1 5 10 15

Gly Leu Ser Leu Thr Ala Phe Ala Ala Thr Thr Ala Thr Val Pro Ala
 20 25 30

Pro Pro Ala Lys Gln Glu Ser Lys Pro Ala Val Ala Ala Asn Pro Ala
 35 40 45

Pro Lys Asn Val Leu Phe Gln Tyr Ser Thr Ile Asn Ala Leu Met Leu
 50 55 60

Gly Gln Phe Glu Gly Asp Leu Thr Leu Lys Asp Leu Lys Leu Arg Gly
 65 70 75 80

Asp Met Gly Leu Gly Thr Ile Asn Asp Leu Asp Gly Glu Met Ile Gln
 85 90 95

Met Gly Thr Lys Phe Tyr Gln Ile Asp Ser Thr Gly Lys Leu Ser Glu
 100 105 110

Leu Pro Glu Ser Val Lys Thr Pro Phe Ala Val Thr Thr His Phe Glu
 115 120 125

Pro Lys Glu Lys Thr Thr Leu Thr Asn Val Gln Asp Tyr Asn Gln Leu
 130 135 140

Thr Lys Met Leu Glu Glu Lys Phe Glu Asn Lys Asn Val Phe Tyr Ala
 145 150 155 160

Val Lys Leu Thr Gly Thr Phe Lys Met Val Lys Ala Arg Thr Val Pro
 165 170 175

Lys Gln Thr Arg Pro Tyr Pro Gln Leu Thr Glu Val Thr Lys Lys Gln
 180 185 190

Ser Glu Phe Glu Phe Lys Asn Val Lys Gly Thr Leu Ile Gly Phe Tyr
 195 200 205

Thr Pro Asn Tyr Ala Ala Ala Leu Asn Val Pro Gly Phe His Leu His
 210 215 220

Phe Ile Thr Glu Asp Lys Thr Ser Gly Gly His Val Leu Asn Leu Gln
 225 230 235 240

Phe Asp Asn Ala Asn Leu Glu Ile Ser Pro Ile His Glu Phe Asp Val
 245 250 255

Gln Leu Pro His Thr Asp Asp Phe Ala His Ser Asp Leu Thr Gln Val
 260 265 270

Thr Thr Ser Gln Val His Gln Ala Glu Ser Glu Arg Lys
 275 280 285

5 <210> 3
 <211> 261

ES 2 929 531 T3

<212> PRT
 <213> *Brevibacillus brevis*

<400> 3

5

Ala Thr Thr Ala Thr Val Pro Ala Pro Pro Ala Lys Gln Glu Ser Lys
 1 5 10 15

Pro Ala Val Ala Ala Asn Pro Ala Pro Lys Asn Val Leu Phe Gln Tyr
 20 25 30

Ser Thr Ile Asn Ala Leu Met Leu Gly Gln Phe Glu Gly Asp Leu Thr
 35 40 45

Leu Lys Asp Leu Lys Leu Arg Gly Asp Met Gly Leu Gly Thr Ile Asn
 50 55 60

Asp Leu Asp Gly Glu Met Ile Gln Met Gly Thr Lys Phe Tyr Gln Ile
 65 70 75 80

Asp Ser Thr Gly Lys Leu Ser Glu Leu Pro Glu Ser Val Lys Thr Pro
 85 90 95

Phe Ala Val Thr Thr His Phe Glu Pro Lys Glu Lys Thr Thr Leu Thr
 100 105 110

Asn Val Gln Asp Tyr Asn Gln Leu Thr Lys Met Leu Glu Glu Lys Phe
 115 120 125

Glu Asn Lys Asn Val Phe Tyr Ala Val Lys Leu Thr Gly Thr Phe Lys
 130 135 140

Met Val Lys Ala Arg Thr Val Pro Lys Gln Thr Arg Pro Tyr Pro Gln
 145 150 155 160

Leu Thr Glu Val Thr Lys Lys Gln Ser Glu Phe Glu Phe Lys Asn Val
 165 170 175

Lys Gly Thr Leu Ile Gly Phe Tyr Thr Pro Asn Tyr Ala Ala Ala Leu
 180 185 190

Asn Val Pro Gly Phe His Leu His Phe Ile Thr Glu Asp Lys Thr Ser
 195 200 205

Gly Gly His Val Leu Asn Leu Gln Phe Asp Asn Ala Asn Leu Glu Ile
 210 215 220

Ser Pro Ile His Glu Phe Asp Val Gln Leu Pro His Thr Asp Asp Phe
 225 230 235 240

Ala His Ser Asp Leu Thr Gln Val Thr Thr Ser Gln Val His Gln Ala
 245 250 255

Glu Ser Glu Arg Lys
 260

ES 2 929 531 T3

<210> 4
 <211> 783
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia madura del gen aldB en el plásmido RIHI-aldB

<400> 4

10

gctacaacgg ctactgtacc agcaccacct gccaaagcagg aatccaaacc tgcggttgcc	60
gctaatccgg caccaaaaaa tgtactgttt caatactcaa cgatcaatgc actcatgctt	120
ggacagtttg aaggggactt gactttgaaa gacctgaagc tgcgagggca tatggggctt	180
ggtaccatca atgatctcga tggagagatg attcagatgg gtacaaaatt ctaccagatc	240
gacagcaccg gaaaattatc ggagctgcc aagagtgtga aaactccatt tgcggttact	300
acacatttcg agccgaaaga aaaaactaca ttaaccaatg tgcaagatta caatcaatta	360
acaaaaatgc ttgaggagaa atttgaaaac aagaacgtct tttatgccgt aaagctgacc	420
ggtactttta agatggtaaa ggctagaaca gttccaaaac aaaccagacc ttatccgcag	480
ctgactgaag taaccaaaaa acaatccgag tttgaattta aaaatgtaa gggaaacctg	540
attggcttct atacgcaaaa ttatgcagca gccctgaatg ttcccggatt ccatctccac	600
ttcatcacag aggataaaac aagtggcgga cacgtattaa atctgcaatt tgacaacgcg	660
aatctgaaa tttctccgat ccatgagttt gatgttcaat tgccgcacac agatgatttt	720
gccactctg atctgacaca agttactact agccaagtac accaagctga gtcagaaaga	780
aaa	783

15

<210> 5
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> proteína precursora aldB expresada a partir del plásmido RIHI-aldB

<400> 5

ES 2 929 531 T3

Val Arg Ser Lys Lys Leu Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Thr Leu
 1 5 10 15
 Ile Phe Thr Met Ala Phe Ser Asn Met Ser Ala Gln Ala Ala Thr Thr
 20 25 30
 Ala Thr Val Pro Ala Pro Pro Ala Lys Gln Glu Ser Lys Pro Ala Val
 35 40 45
 Ala Ala Asn Pro Ala Pro Lys Asn Val Leu Phe Gln Tyr Ser Thr Ile
 50 55 60
 Asn Ala Leu Met Leu Gly Gln Phe Glu Gly Asp Leu Thr Leu Lys Asp
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Arg Gly Asp Met Gly Leu Gly Thr Ile Asn Asp Leu Asp
 85 90 95
 Gly Glu Met Ile Gln Met Gly Thr Lys Phe Tyr Gln Ile Asp Ser Thr
 100 105 110
 Gly Lys Leu Ser Glu Leu Pro Glu Ser Val Lys Thr Pro Phe Ala Val
 115 120 125
 Thr Thr His Phe Glu Pro Lys Glu Lys Thr Thr Leu Thr Asn Val Gln
 130 135 140
 Asp Tyr Asn Gln Leu Thr Lys Met Leu Glu Glu Lys Phe Glu Asn Lys
 145 150 155 160
 Asn Val Phe Tyr Ala Val Lys Leu Thr Gly Thr Phe Lys Met Val Lys
 165 170 175
 Ala Arg Thr Val Pro Lys Gln Thr Arg Pro Tyr Pro Gln Leu Thr Glu
 180 185 190
 Val Thr Lys Lys Gln Ser Glu Phe Glu Phe Lys Asn Val Lys Gly Thr
 195 200 205

ES 2 929 531 T3

Leu Ile Gly Phe Tyr Thr Pro Asn Tyr Ala Ala Ala Leu Asn Val Pro
 210 215 220

Gly Phe His Leu His Phe Ile Thr Glu Asp Lys Thr Ser Gly Gly His
 225 230 235 240

Val Leu Asn Leu Gln Phe Asp Asn Ala Asn Leu Glu Ile Ser Pro Ile
 245 250 255

His Glu Phe Asp Val Gln Leu Pro His Thr Asp Asp Phe Ala His Ser
 260 265 270

Asp Leu Thr Gln Val Thr Thr Ser Gln Val His Gln Ala Glu Ser Glu
 275 280 285

Arg Lys
 290

5 <210> 6
 <211> 858
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia que codifica una acetolactato descarboxilasa

15 <400> 6

```

atgaaaaaaaa atatcatcac ttctatcaca tctctggctc tcggtgccgg gctgtctttg      60
actgctttttg cagctacaac ggctactgta ccagcaccac ctgccaagca ggaatccaaa      120
cctgtgggttg cgcctaatac gccacaaaaa aatgtactgt ttcaatactc aacgatcaat      180
gcaactcatgc ttggacagtt tgaaggggac ttgactttga aagacctgaa gctacgaggc      240
gatatggggc ttggtaccat caatgatctc gatggagaga tgattcagat ggttacaana      300
ttctaccaga tcgacagcac cggaaaatta tccgagctgc cagaaagtgt gaaaactcca      360
tttgcggtta ctacacattt cgagccgaaa gaaaaaacta cattaaccaa tgtgcaagat      420
tacaatcaat taacaaaaat gcttgaggag aaatttgaaa acaagaacgt cttttatgcc      480
gtaaagctga cgggtacctt taagatggta aaggctagaa cagttccaaa acaaaccaga      540
ccttatccgc agctgactga agtaacaaaa aaacaatccg agtttgaatt taaaatggt      600
aaggaaccc tgattggctt ctatacgcca aattatgcag cagccctgaa tgttcccgga      660
ttccatctcc acttcatcac agaggataaa acaagtggcg gacacgtatt aaatctgcaa      720
tttgacaacg cgaatctgga aatttctccg atccatgagt ttgatgtaca attgccgcac      780
acagatgatt ttgccactc tgatctgaca caagttacta ctagccaagt acaccaagct      840
gagtcagaaa gaaaataa                                     858
  
```

20 <210> 7
 <211> 285
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de precursor de acetolactato descarboxilasa (ALDC) aldB

ES 2 929 531 T3

<400> 7

Met Lys Lys Asn Ile Ile Thr Ser Ile Thr Ser Leu Ala Leu Val Ala
 1 5 10 15
 Gly Leu Ser Leu Thr Ala Phe Ala Ala Thr Thr Ala Thr Val Pro Ala
 20 25 30
 Pro Pro Ala Lys Gln Glu Ser Lys Pro Val Val Ala Ala Asn Pro Ala
 35 40 45
 Pro Lys Asn Val Leu Phe Gln Tyr Ser Thr Ile Asn Ala Leu Met Leu
 50 55 60
 Gly Gln Phe Glu Gly Asp Leu Thr Leu Lys Asp Leu Lys Leu Arg Gly
 65 70 75 80
 Asp Met Gly Leu Gly Thr Ile Asn Asp Leu Asp Gly Glu Met Ile Gln
 85 90 95
 Met Gly Thr Lys Phe Tyr Gln Ile Asp Ser Thr Gly Lys Leu Ser Glu
 100 105 110
 Leu Pro Glu Ser Val Lys Thr Pro Phe Ala Val Thr Thr His Phe Glu
 115 120 125
 Pro Lys Glu Lys Thr Thr Leu Thr Asn Val Gln Asp Tyr Asn Gln Leu
 130 135 140
 Thr Lys Met Leu Glu Glu Lys Phe Glu Asn Lys Asn Val Phe Tyr Ala
 145 150 155 160
 Val Lys Leu Thr Gly Thr Phe Lys Met Val Lys Ala Arg Thr Val Pro
 165 170 175
 Lys Gln Thr Arg Pro Tyr Pro Gln Leu Thr Glu Val Thr Lys Lys Gln
 180 185 190
 Ser Glu Phe Glu Phe Lys Asn Val Lys Gly Thr Leu Ile Gly Phe Tyr
 195 200 205

5

ES 2 929 531 T3

Thr Pro Asn Tyr Ala Ala Ala Leu Asn Val Pro Gly Phe His Leu His
 210 215 220

Phe Ile Thr Glu Asp Lys Thr Ser Gly Gly His Val Leu Asn Leu Gln
 225 230 235 240

Phe Asp Asn Ala Asn Leu Glu Ile Ser Pro Ile His Glu Phe Asp Val
 245 250 255

Gln Leu Pro His Thr Asp Asp Phe Ala His Ser Asp Leu Thr Gln Val
 260 265 270

Thr Thr Ser Gln Val His Gln Ala Glu Ser Glu Arg Lys
 275 280 285

<210> 8

<211> 261

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia de aminoácidos predicha de la acetolactato descarboxilasa (ALDC) madura aldB

<400> 8

Ala Thr Thr Ala Thr Val Pro Ala Pro Pro Ala Lys Gln Glu Ser Lys
 1 5 10 15

Pro Val Val Ala Ala Asn Pro Ala Pro Lys Asn Val Leu Phe Gln Tyr
 20 25 30

Ser Thr Ile Asn Ala Leu Met Leu Gly Gln Phe Glu Gly Asp Leu Thr
 35 40 45

Leu Lys Asp Leu Lys Leu Arg Gly Asp Met Gly Leu Gly Thr Ile Asn
 50 55 60

Asp Leu Asp Gly Glu Met Ile Gln Met Gly Thr Lys Phe Tyr Gln Ile
 65 70 75 80

Asp Ser Thr Gly Lys Leu Ser Glu Leu Pro Glu Ser Val Lys Thr Pro
 85 90 95

Phe Ala Val Thr Thr His Phe Glu Pro Lys Glu Lys Thr Thr Leu Thr
 100 105 110

Asn Val Gln Asp Tyr Asn Gln Leu Thr Lys Met Leu Glu Glu Lys Phe
 115 120 125

ES 2 929 531 T3

Glu Asn Lys Asn Val Phe Tyr Ala Val Lys Leu Thr Gly Thr Phe Lys
 130 135 140

Met Val Lys Ala Arg Thr Val Pro Lys Gln Thr Arg Pro Tyr Pro Gln
 145 150 155 160

Leu Thr Glu Val Thr Lys Lys Gln Ser Glu Phe Glu Phe Lys Asn Val
 165 170 175

Lys Gly Thr Leu Ile Gly Phe Tyr Thr Pro Asn Tyr Ala Ala Ala Leu
 180 185 190

Asn Val Pro Gly Phe His Leu His Phe Ile Thr Glu Asp Lys Thr Ser
 195 200 205

Gly Gly His Val Leu Asn Leu Gln Phe Asp Asn Ala Asn Leu Glu Ile
 210 215 220

Ser Pro Ile His Glu Phe Asp Val Gln Leu Pro His Thr Asp Asp Phe
 225 230 235 240

Ala His Ser Asp Leu Thr Gln Val Thr Thr Ser Gln Val His Gln Ala
 245 250 255

Glu Ser Glu Arg Lys
 260

REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar la actividad y/o estabilidad de una enzima ALDC de EC 4.1.1.5, comprendiendo dicho método la etapa de añadir cinc a un medio de fermentación y/o medio de maduración que comprende una célula huésped que produce ALDC durante una fermentación de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake:
- (i) a una concentración de 1 μM a 300 μM , preferiblemente de 6 μM a 300 μM ; o
- (ii) a una concentración de 1 μM a 50 μM ; o
- (iii) a una concentración de 1 μM a 25 μM , preferiblemente de 6 μM a 25 μM ; o
- (iv) como composición que comprende ALDC y cinc, en la que:
- (a) dicho cinc está presente en dicha composición a una concentración de 1 mM a 5 mM; o
- (b) la relación molar de cinc con respecto a enzima ALDC en la composición es mayor de 1; o 2:1 o mayor; o 10:1 o mayor; o 20:1 o mayor; o 30:1 o mayor; o 60:1 o mayor.
2. El método según la reivindicación 1, en el que dicha enzima ALDC y dicho cinc se añaden durante un proceso de fermentación o un proceso de maduración.
3. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha enzima ALDC se añade a una concentración de 0,5 g a 10 g por hectolitro de fermento de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake.
4. El método según cualquier reivindicación anterior, en el que dicha enzima ALDC se añade a una concentración de 1 g a 5 g por hectolitro de fermento de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake.
5. El método según cualquier reivindicación anterior, en el que la actividad de dicha enzima ALDC está en el intervalo de 1000 a 2500 unidades por mg de proteína.
6. El método según cualquier reivindicación anterior, en el que dicha enzima ALDC es de *Lactobacillus casei*, *Brevibacterium acetyllicum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Lactococcus lactis DX* o *Bacillus licheniformis*, en el que preferiblemente la enzima ALDC es de *Bacillus brevis* o *Bacillus licheniformis*.
7. El método según cualquier reivindicación anterior, en el que dicha enzima ALDC tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de identidad con una cualquiera seleccionada de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 o cualquier fragmento funcional de las mismas.
8. Un medio de fermentación y/o medio de maduración de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake que comprende una composición que comprende una enzima ALDC de EC 4.1.1.5 y cinc, en el que dicha composición comprende cinc a una concentración de 1 μM a 200 mM, preferiblemente en el que:
- (i) el cinc está presente en la composición a una concentración de 1 μM a 300 μM , preferiblemente de 6 μM a 300 μM ; o
- (ii) el cinc está presente en la composición a una concentración de 1 μM a 50 μM , preferiblemente de 6 μM a 50 μM , o de 6 μM a 25 μM ; o
- (iii) el cinc y la enzima ALDC se añaden en una composición, estando presente el cinc en la composición a una concentración de 1 mM a 20 mM, preferiblemente de 1 mM a 5 mM; o
- (iv) el cinc y la enzima ALDC se añaden en una composición, siendo la relación molar de cinc con respecto a enzima ALDC en la composición mayor de 1; o 2:1 o mayor; o 10:1 o mayor; o 20:1 o mayor; o 30:1 o mayor; o 60:1 o mayor.
9. El medio de fermentación y/o medio de maduración de cerveza y/o vino y/o sidra y/o perada y/o sake según la reivindicación 8, en el que: la actividad de dicha enzima ALDC está en el intervalo de 1000 a 2500 unidades por mg de proteína; y/o comprendiendo dicho medio además al menos una enzima o derivado de enzima adicional seleccionado del grupo que consiste en acetolactato reductoisomerasas, acetolactato isomerasas, amilasa, glucoamilasa, hemicelulasa, celulasa, glucanasa, pululanasa, isoamilasa, endo-glucanasa y enzimas accesorias hidrolíticas de beta-glucano relacionadas, xilanasa, enzimas accesorias de xilanasa (por ejemplo, arabinofuranosidasa, ácido ferúlico esterasa y xilano acetilesterasa) y proteasa.

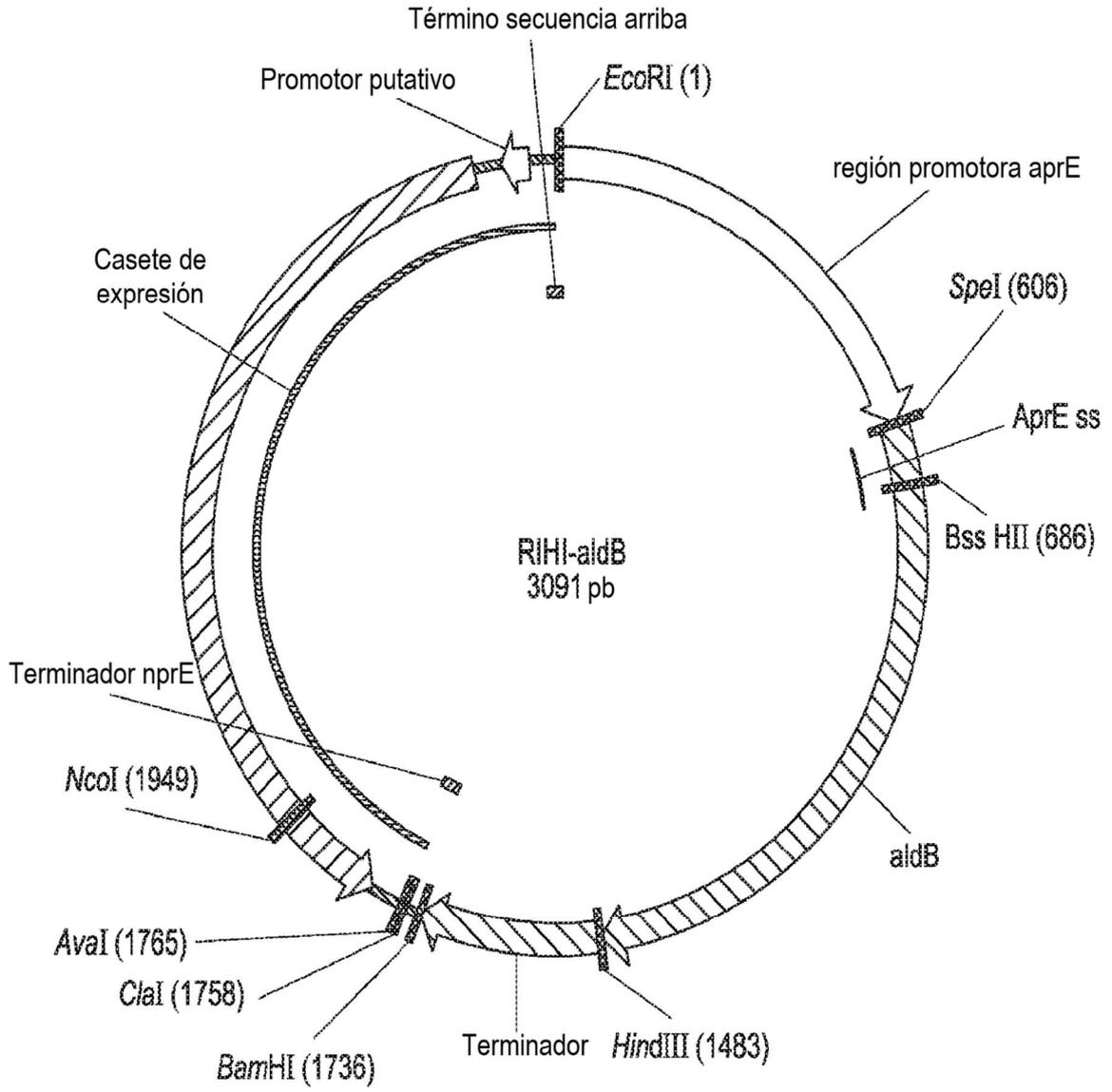


FIG. 1

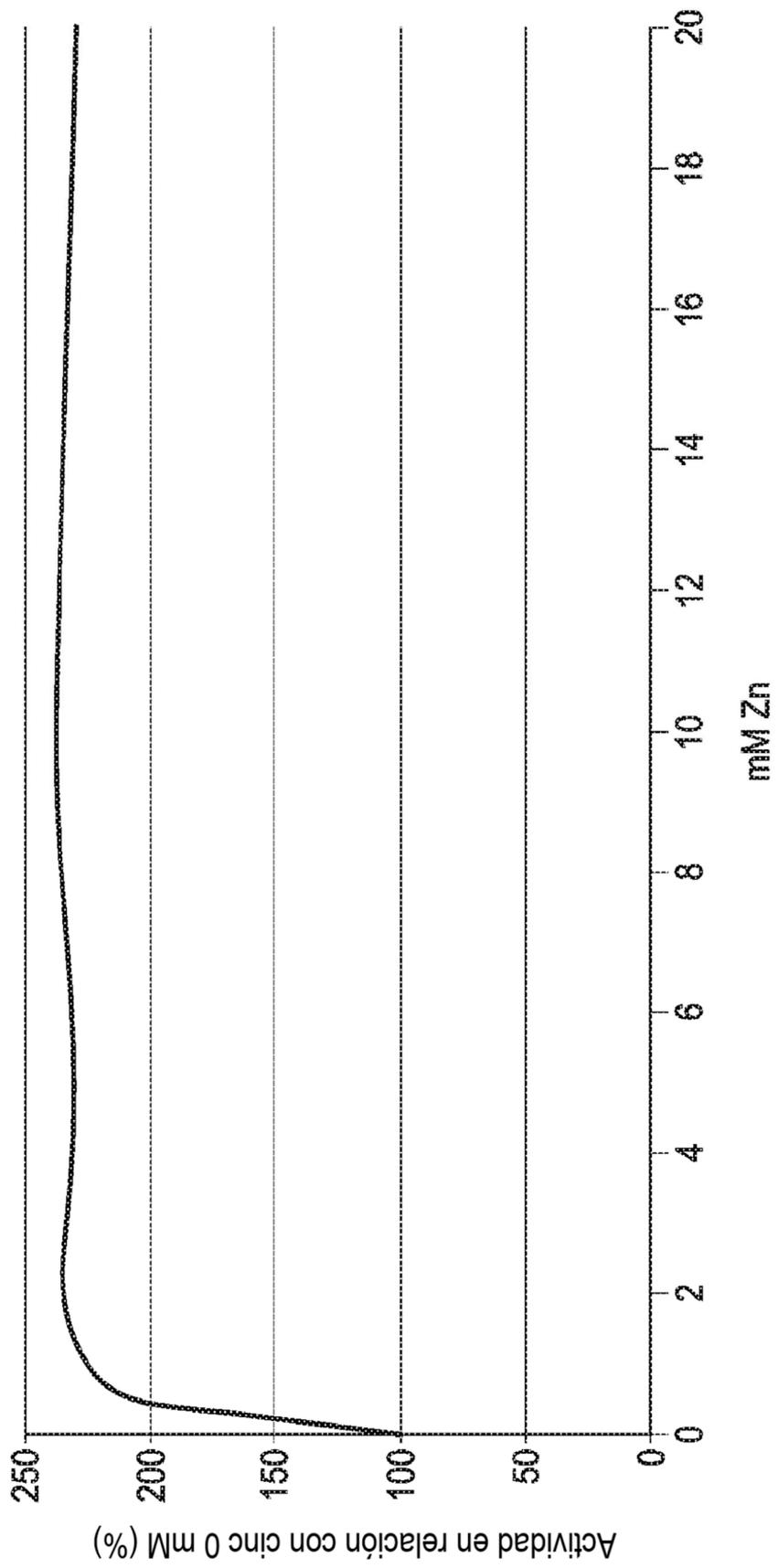
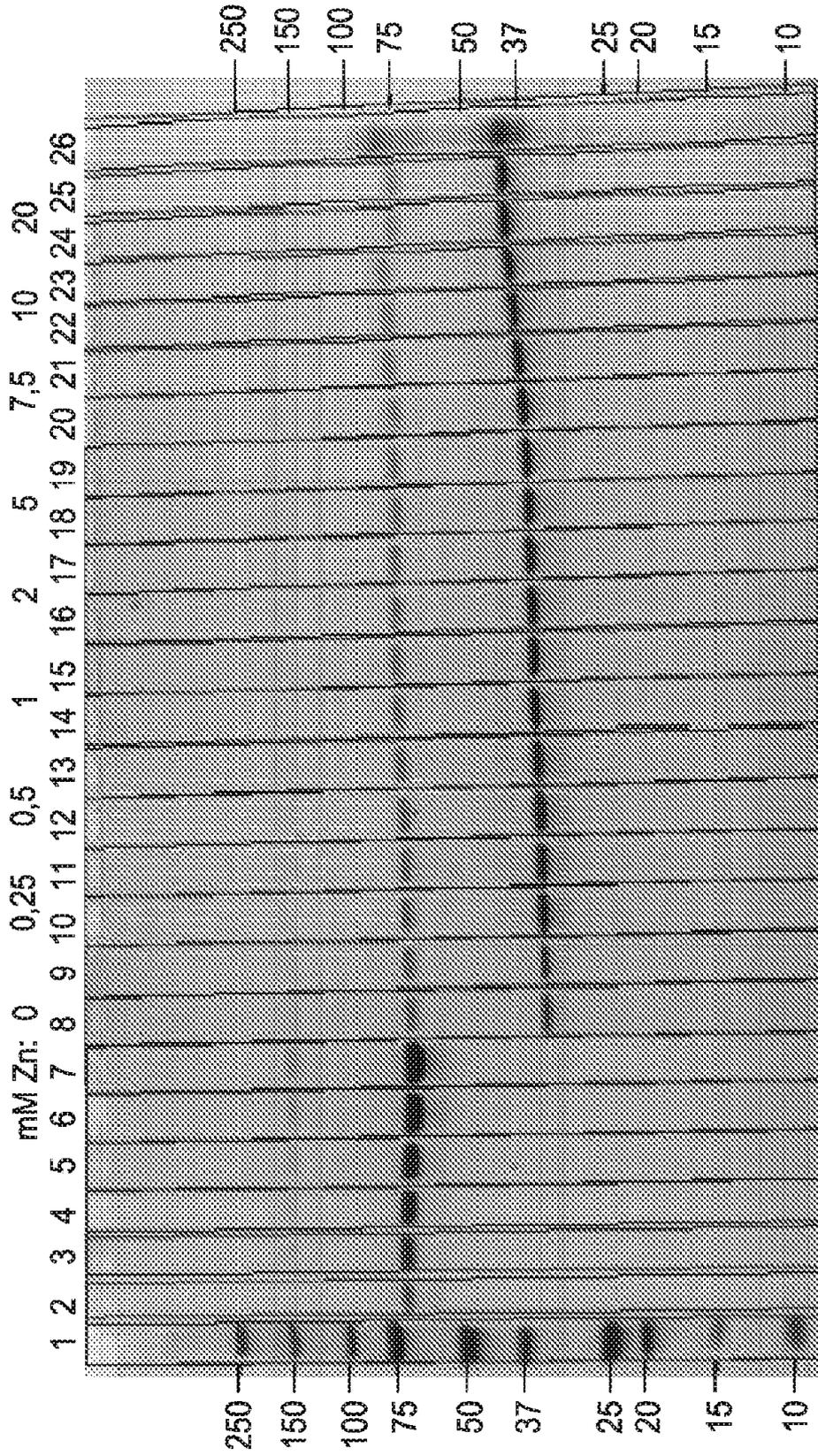


FIG. 2



Patr.

FIG. 3A

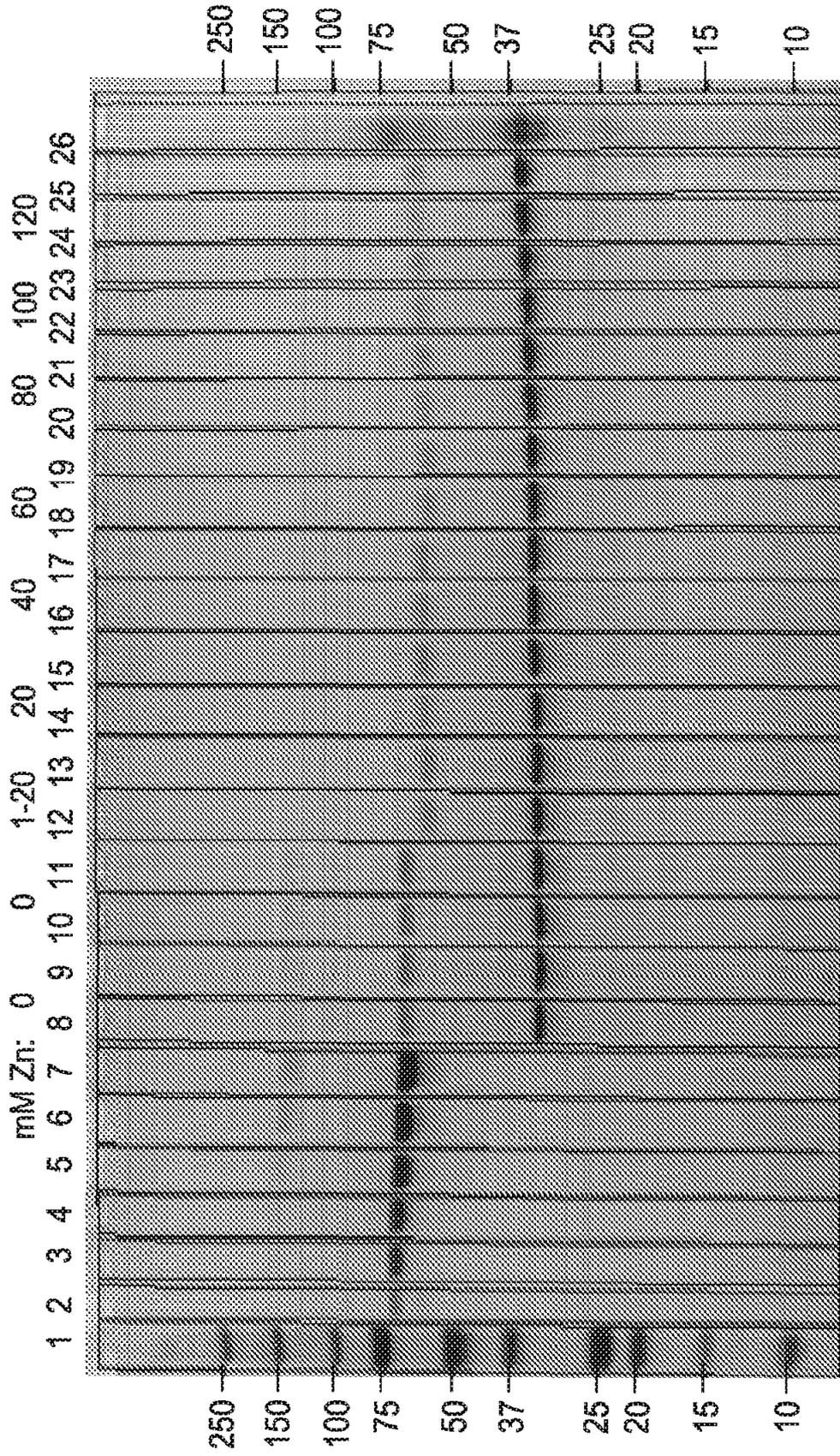


FIG. 3B

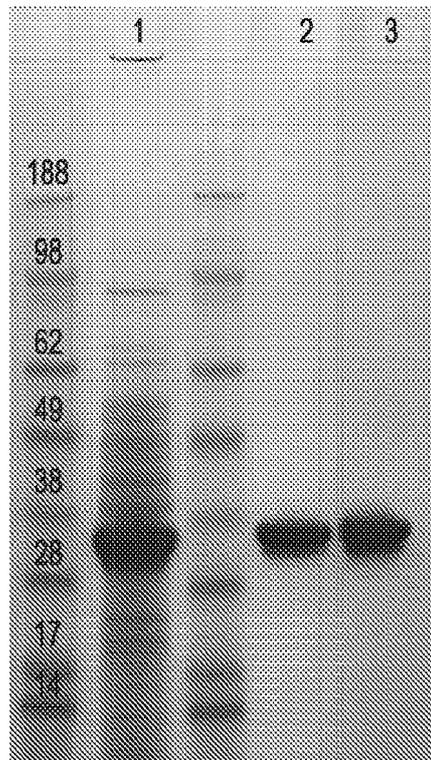


FIG. 4

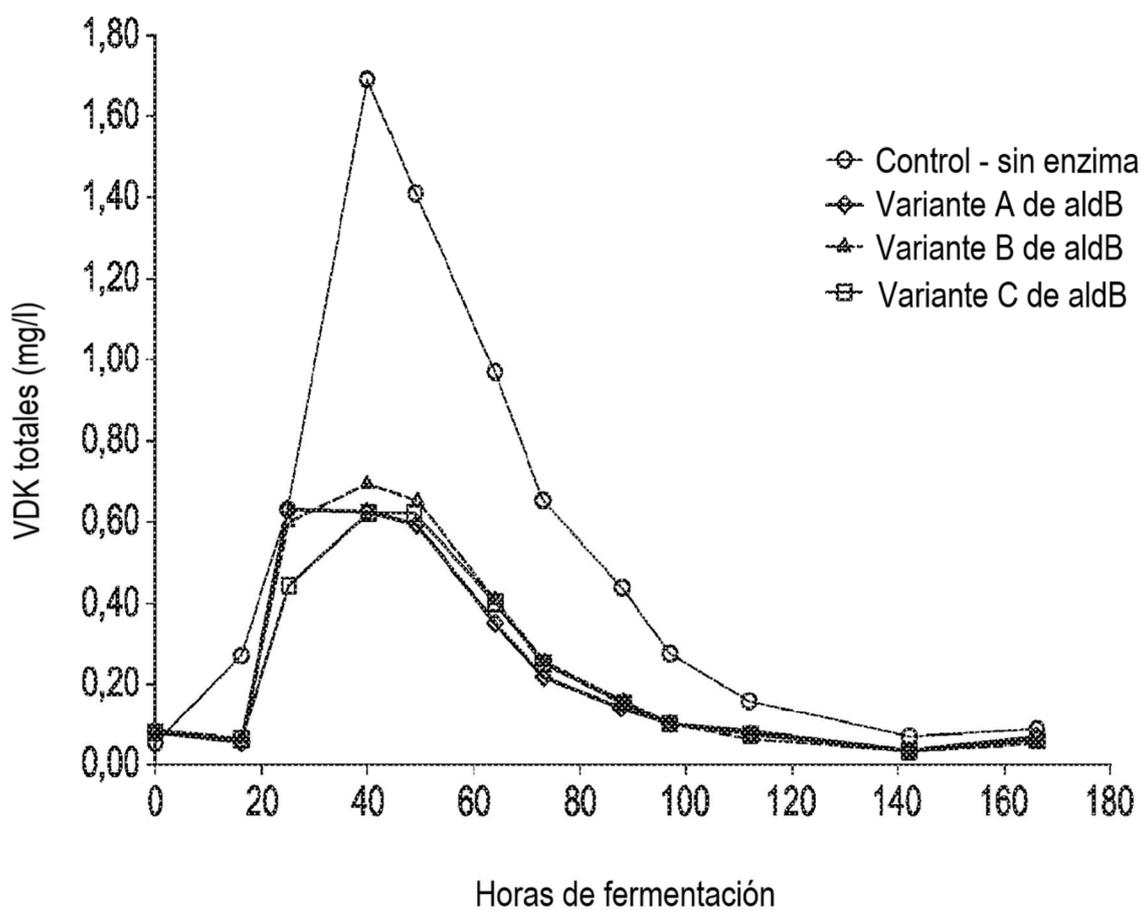


FIG. 5

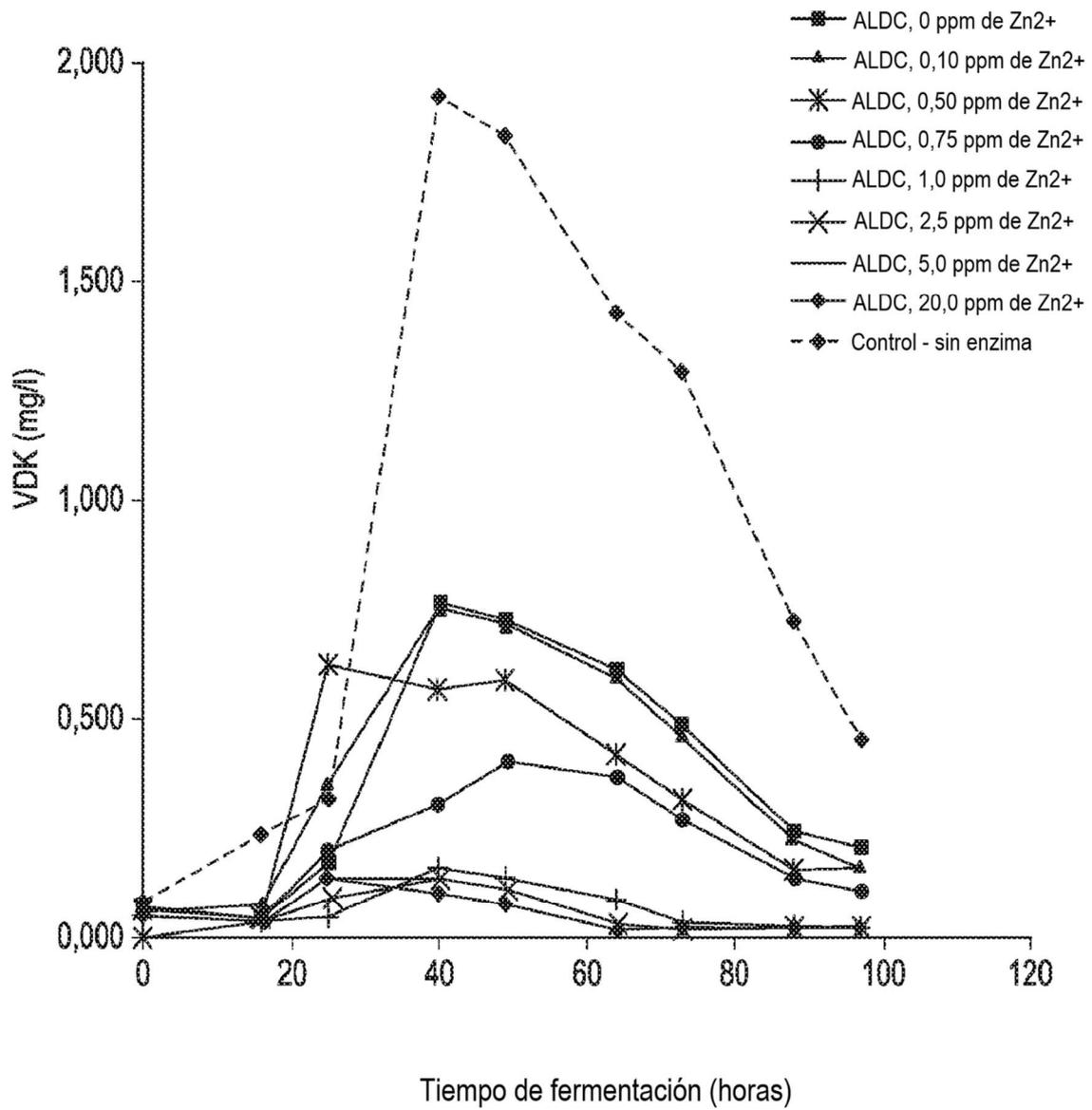


FIG. 6