

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 917**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/37** (2006.01)

**C12N 9/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2012 PCT/EP2012/076352**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO2013092840**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2012 E 12812244 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2794641**

54 Título: **Polipéptidos que tienen actividad de glucoamilasa y método para producirlos**

30 Prioridad:

**22.12.2011 US 201161579429 P**  
**16.01.2012 EP 12151285**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.06.2017**

73 Titular/es:

**DuPont Nutrition Biosciences ApS (100.0%)**  
**Langebrogade 1 P.O. Box 17**  
**1001 Copenhagen K, DK**

72 Inventor/es:

**CRAMER, JACOB, FLYVHOLM;**  
**FISH, NEVILLE, MARSHALL;**  
**DEGN, PETER, EDVARD;**  
**NIKOLAEV, IGOR;**  
**KRUIHOF, PAULIEN;**  
**VAN SOLINGEN, PIET;**  
**VAN STIGT THANS, SANDER;**  
**BRENEMAN, SUZY;**  
**SHETTY, JAYARAMA K. y**  
**LEE, SUNG, HO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 616 917 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

Polipéptidos que tienen actividad de glucoamilasa y método para producirlos

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a polipéptidos que tienen actividad de glucoamilasa con propiedades mejoradas y a composiciones que comprenden estos polipéptidos adecuados para uso en la producción de un alimento, una bebida (p. ej., cerveza), pienso o biocombustible. También se describe un procedimiento mejorado y rentable para aislar glucoamilasas adecuadas para procedimientos de purificación de proteínas a gran escala. Asimismo, se describen distintos métodos y usos relacionados con las glucoamilasas de acuerdo con la invención, tales como en un procedimiento de elaboración de cerveza.

**10 Antecedentes**

Las glucoamilasas (glucan 1,4- $\alpha$ -glucohidrolasas, EC 3.2.1.3) son carbohidrasas de acción exógena que hidrolizan almidón, que catalizan la eliminación de unidades sucesivas de glucosa de los extremos no reductores del almidón o moléculas relacionadas de oligo y polisacáridos. Las glucoamilasas pueden hidrolizar los enlaces glucosídicos lineales y ramificados del almidón (p. ej., amilosa y amilopectina). Las glucoamilasas son producidas por numerosas cepas de bacterias, hongos y plantas. Ciertas glucoamilasas fúngicas se producen y segregan, como a partir de cepas de *Aspergillus*.

Otros hongos tales como *Monascus*, tiene una larga trayectoria en la preparación de alimentos fermentados. Por ejemplo, se han utilizado las cepas de *Monascus* para la fabricación de tofu en China y Japón. Históricamente, el hongo se ha utilizado principalmente como aditivo para alimentos. El organismo típicamente se desarrolla en arroz, se seca y se tritura, y se añade como 'RotReis' a productos alimenticios. También se producen varios ingredientes con la especie de *Monascus*. Por ejemplo pigmentos utilizados en el hogar y en la industria se producen a partir de *Monascus purpureus*.

20 *Monascus* también se emplea en medicina alternativa. Por ejemplo, el arroz rojo de levadura, que es arroz infectado con *Monascus purpureus*, es un producto alimentario natural que se entiende reduce el colesterol en la sangre. El componente activo, un inhibidor de HMG-CoA reductasa, reduce el colesterol total en la sangre, además de los niveles de colesterol LDL en la sangre, y puede incluso revertir la arteriopatía coronaria. El producto producido por *Monascus purpureus* ha sido denominado Monacolin K, o Cholestin (Phamanex).

También se ha afirmado que el extracto de fermentación de *Monascus* actúa como un fármaco antineoplásico, según se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2004/0081663 A1. En la patente de EE.UU. núm. 6.613.365, se describe el uso de *Monascus kaoliang* en pienso para animales.

El documento JP2007097462 describe el cultivo de *Monascus purpureus* para producir *koji* líquido (para uso en la elaboración de alimentos/bebidas fermentados), que comprende actividad detectable de glucoamilasa.

La patente de EE.UU. núm. 4.870.014 describe la clonación de glucoamilasa termolábil de *S. diastaticus* y su expresión en *S. cerevisiae* para uso durante la etapa de fermentación en elaboración de cerveza. La patente de EE.UU. núm. 4.318.989 describe métodos para producir glucoamilasa (glucoamilasaS y exo-pululanasa) a partir de *Cladosporium resinae* para uso durante la etapa de fermentación de la elaboración de cerveza.

Se sabe bien que las glucoamilasas son enzimas comerciales muy importantes, y se han utilizado en una amplia gama de aplicaciones que requieren la hidrólisis de almidón (p. ej., para producir glucosa y otros monosacáridos a partir de almidón). No obstante, el volumen de glucoamilasa comercial es producido por cepas de *Aspergillus niger*.

40 Una porción importante del producto de proteína segregada de estas fuentes fúngicas es alfa amilasa, que es un producto no deseable cuando la meta es el aislamiento de glucoamilasa. La presencia de estas enzimas indeseadas y otros productos proteínicos secundarios demora el proceso de aislamiento de la glucoamilasa deseada, e inevitablemente reduce el rendimiento total por partida. Por lo tanto, existe todavía la necesidad de producir y aislar una producción de glucoamilasa de alta calidad y a la vez reducir los productos indeseados en el proceso de producción.

Se describieron la purificación y las propiedades de dos formas de glucoamilasa de *Monascus* (Iizuka et al., (1977), J. Gen. Appl. Microbiol., 23(5): 217-230; Iizuka et al., (1978), J. Gen. Appl. Microbiol., 24: 185-192). Se indicó que ambas glucoamilasas son estables hasta 50°C, pero a una temperatura alrededor de 60°C-70°C, las actividades de la glucoamilasa se reducen drásticamente. Las secuencias de las dos formas de glucoamilasas no se describieron en este artículo ni en publicaciones posteriores.

El uso de glucoamilasas en la hidrólisis de carbohidrato derivado de almidón tiene una importancia cada vez mayor en la industria de elaboración de cerveza, particularmente para la producción de cervezas altamente atenuadas (algunas veces denominadas de bajas calorías). Por motivos relacionados con la estabilidad y legislación del producto, es importante que se elimine/inactive la actividad enzimática añadida en la cerveza final.

Desafortunadamente, este requerimiento es difícil de cumplir debido a la termoestabilidad de las enzimas, cuando la glucoamilasa deriva de la fuente usual *Aspergillus spp.*, como *A. niger* y *A. awamori*; *Humicola spp.*; *Talaromyces spp.*, tal como *T. emersonii*; *Athelia spp.*, tal como *A. rolfsii*; *Penicillium spp.*, tal como *P. chrysogenum*, por ejemplo, y la enzima se añade al recipiente de fermentación (FV) en el procedimiento de elaboración de cerveza.

5 Si bien la adición de glucoamilasa al recipiente de trituración, en cualquier etapa anterior a la ebullición del mosto, puede evitar este problema, esto introduce otras dificultades prácticas. La patente de EE.UU. núm. 4.666.718 describe un procedimiento de elaboración de cerveza que emplea un reactor que comprende la enzima glucoamilasa de elaboración de cerveza inmovilizada en un soporte sólido, mediante el cual la enzima puede recuperarse del producto. La patente de EE.UU. núm. 5.422.267A describe un procedimiento de elaboración de cerveza que emplea levadura genéticamente modificada que expresa glucoamilasa recombinante, pero en donde la enzima es segregada por la levadura.

10 Por lo tanto, existe la necesidad de polipéptidos, por ejemplo en la forma de una composición que tenga actividad de glucoamilasa, que se puedan añadir a cualquier etapa de un procedimiento convencional para preparar una bebida fermentada tal como cerveza, usando equipos convencionales, y cuya actividad pueda eliminarse de manera segura del producto final.

15 Sería especialmente eficiente añadir polipéptidos que tengan actividad de glucoamilasa, por ejemplo en la forma de una composición en un recipiente de fermentación (FV) utilizado en la preparación de una bebida fermentada. Los beneficios son, por ejemplo, menores dosis de enzimas, mayor conversión del almidón a carbohidrato fermentable (por ejemplo a través de baja producción de isomaltosa) y menor estrés de la levadura. El motivo por el cual este planteamiento no se utiliza habitualmente es que las enzimas activas luego pueden estar presentes en el producto final, lo cual, como se describió anteriormente, resulta indeseable. Las glucoamilasas comercialmente disponibles son en general termostables y la energía aplicada durante la pasteurización de una bebida fermentada no es suficiente para inactivar las enzimas. Por consiguiente, existe una necesidad adicional de una glucoamilasa termolábil que pueda inactivarse por pasteurización después de la fermentación.

## 25 **Compendio**

La presente invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad de glucoamilasa, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80% identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el polipéptido maduro de las SEC ID NÚM: 3 y 6.

30 La presente descripción se refiere también a un polipéptido aislado que tiene actividad de glucoamilasa seleccionado del grupo que consiste en:

a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el polipéptido maduro de las SEC ID NÚM: 3 y 6;

35 b) un polipéptido codificado por i) la secuencia de ácidos nucleicos comprendida en la SEC ID NÚM:1 o la SEC ID NÚM:4, o ii) la secuencia de ADNc de i), o iii) la secuencia de SEC ID NÚM:2 o SEC ID NÚM:5; o iv) por un polinucleótido que se hibrida bajo por lo menos condiciones de baja rigurosidad con la cadena complementaria de i), ii) o iii);

40 c) un polipéptido que comprende una sustitución, eliminación y/o inserción conservadora de uno o más aminoácidos de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el polipéptido maduro de las SEC ID NÚM: 3 y 6;

d) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con el polipéptido maduro que codifica las SEC ID NÚM: 3 o 6; y

e) un fragmento de un polipéptido de a), b) c) o d) que posee actividad de glucoamilasa.

45 La presente invención se refiere además a polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos capaz de codificar un polipéptido de la presente invención.

50 La presente invención se refiere además a un ácido nucleico capaz de expresar un polipéptido de la presente invención. La presente invención se refiere además a un vector de expresión tal como un vector de expresión recombinante y una célula hospedante tal como una célula hospedante recombinante que comprende el ácido nucleico o es capaz de expresar un polipéptido de la presente invención. La presente invención también se refiere a una célula hospedante que tiene expresión heteróloga de un polipéptido de la presente invención. La presente invención se refiere además a métodos para aislar, producir y/o expresar un polipéptido de la presente invención.

La presente invención también se refiere a una composición que comprende uno o más polipéptidos de la presente invención.

La presente descripción también se refiere al uso de un polipéptido o una composición de la presente invención en una fermentación, en donde dicho polipéptido o composición se añade antes o durante la etapa de fermentación.

5 La presente descripción también se refiere al uso de un polipéptido temolábil de la presente invención para mejorar la producción de azúcares fermentables en la etapa de fermentación de un procedimiento de elaboración de cerveza.

La presente invención también se refiere a un método que comprende añadir un polipéptido o una composición de la invención antes o durante una etapa de fermentación.

La presente descripción también se refiere a una bebida fermentada, en donde la bebida fermentada es producida por un método de la presente invención.

10 La presente invención también se refiere a un método para la producción de un alimento, pienso o producto para beber, tal como una bebida alcohólica o no alcohólica, tal como una bebida a base de cereal o malta como cerveza o whisky, tal como vino, cidra, vinagre, vino de arroz, salsa de soya o jugo, en donde dicho método comprende la etapa de tratar un material vegetal que contiene almidón y/o azúcar con un polipéptido o una composición de la presente invención.

15 La presente descripción también se refiere a un kit que comprende un polipéptido, o una composición de la presente invención; e instrucciones para uso de dicho polipéptido o composición.

### Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 ilustra un análisis SDS-PAGE del caldo de fermentación de diversas cepas fúngicas de tipo silvestre, incluida *Monascus kaoliang*.

20 La FIG. 2 ilustra un análisis SDS-PAGE del caldo de fermentación de *Monascus kaoliang*, que muestra dos bandas de proteínas, una de un tamaño similar al intervalo de tamaño de las glucoamilasas de otros hongos filamentosos (62 kDa), y una segunda de aproximadamente 49 kDa.

La FIG. 3 ilustra otro análisis SDS-PAGE del caldo de fermentación de muestras de *Monascus kaoliang*, que muestra una banda de proteínas de aproximadamente 62 kDa.

25 La FIG. 4 ilustra un análisis de SDS-PAGE del caldo de fermentación de *Monascus kaoliang* (muestra de la izquierda) en comparación con aquel de *Aspergillus niger* (muestra de la derecha). El caldo de fermentación de *Aspergillus niger* (muestra de la derecha) contiene una alfa amilasa segregada, mientras que el caldo de fermentación de *Monascus kaoliang* (muestra de la izquierda) muestra solamente la glucoamilasa.

30 La FIG. 5 ilustra la velocidad y el rendimiento de la producción de etanol en presencia de glucoamilasa de *Monascus kaoliang* (MkGA) en comparación con la glucoamilasa de *Aspergillus niger* (AnGA). La velocidad de producción de etanol es más rápida con MkGA que con AnGA cuando se dosifican en forma equivalente a 0,325 unidades de glucoamilasa/g sólidos secos (DS) de almidón licuado. Cuando se dosificó a 0,4 unidades de glucoamilasa/g DS, la velocidad de producción del etanol con MkGA fue incluso más veloz. El rendimiento del alcohol final fue comparable independientemente de la dosis o la enzima.

35 La FIG. 6 ilustra la cantidad de almidón residual insoluble que permanece después de la fermentación de la levadura de almidón licuado en presencia de glucoamilasa de *Aspergillus niger* (AnGA) o *Monascus kaoliang* (MkGA). Dosificación de glucoamilasa: 325 unidades de AnGA por gramo de sólidos secos de almidón licuado en el tubo de la izquierda; 325 unidades y 400 unidades MkGA por gramo de sólidos secos de almidón licuado en el tubo del centro y de la derecha, respectivamente.

40 La FIG. 7 ilustra la pérdida de peso durante la fermentación de levadura de un mosto en presencia o ausencia de DIAZYME® X4 o un número equivalente de unidades de glucoamilasa *Monascus kaoliang* (MkGA) en un periodo de 175 h. El control es sin enzima.

45 La FIG. 8 ilustra el análisis HPLC de carbohidratos de mostos fermentados con adición de: MkGA I, MkGA II, DIAZYME® X4 y sin enzima. Los componentes enumerados se cuantificaron (% p/v) por HPLC (columna de oligosacáridos Phenomenex RSO, detector RI) a partir de estándares externos de etanol, glicerol y glucosa en distintos puntos de tiempo durante la fermentación.

50 La FIG. 9 ilustra actividad de glucoamilasa residual de A) MkGA I, B) MkGA II y C) DIAZYME® X4 (usando un sustrato de  $\beta$ -D-maltósido) como función de tiempo de pasteurización y unidades de pasteurización (PU) a 72°C. La actividad de glucoamilasa residual se midió en cerveza Royal Pilsner (cuadrado relleno), Budweiser Pilsner (triángulo), Newcastle Brown ale (círculo relleno), Thisted bryghus Porter (cuadrado) y Na-acetato 0,1 M pH (4,7) (línea de puntos). Los resultados se exponen como un promedio de 2 determinaciones.

La FIG. 10 es un mapa esquemático de secuencias de CDS y genómicas de MkGA I/II.

La FIG. 11 es un mapa esquemático de 5 plásmidos de expresión para diferentes secuencias de glucoamilasa *M. kaoliang* y un mapa esquemático del vector de destino pTTT-pyrG13.

5 La FIG. 12 ilustra un análisis SDS-PAGE de muestras de fermentación de *Hypocrea jecorina* que expresan distintas secuencias codificantes de *M. kaoliang* GA: 1, clon genómico de MkGA II; 2, clon de ADNc de MkGA II; 3, clon genómico de MkGA I; 4, clon de ADNc de MkGA I; 5, clon genómico de MkGA I comenzando por ATG en dirección 5'; 6, cepa receptora. Se cargaron 20  $\mu$ l de muestras de cultivo filtradas por sonda en bandas específicas de 10 % SDS-PAGE. Las bandas específicas de GA se indican con flechas.

La FIG. 13 ilustra SDS-PAGE de muestras de fermentación de *H. jecorina* que expresan dos secuencias codificantes distintas de *M. kaoliang* GA (MkGA I y MkGA II) y las dos GA purificadas de *M. kaoliang*.

10 La FIG. 14 ilustra valores RDF determinados para proteínas GA (fermentos, proteínas y productos purificados) aplicados al FV con actividad similar (10M-GAU), usando un mosto de extracto de malta. Los resultados son un promedio de 2 determinaciones. Las barras de errores son  $\pm$  estándares.

### Descripción detallada

15 Las glucoamilasas son enzimas comercialmente importantes en una amplia variedad de aplicaciones que requieren la hidrólisis de almidón. Se describen en este documento polipéptidos que tienen actividad de glucoamilasa en la caracterización de glucoamilasa derivada de *Monascus kaoliang*, MkGA I y MkGA II, incluidas las secuencias de aminoácidos y secuencias de ADN que codifican glucoamilasa MkGA I y MkGA II, purificadas de *Monascus kaoliang*. También se describe un procedimiento mejorado y rentable para aislar las glucoamilasas descritas en este documento, o sus variantes, adecuadas para procedimientos de purificación de proteínas a gran escala.

20 Asimismo, se describe en este documento que especialmente una de las dos glucoamilasas de *Monascus kaoliang*, MkGA I, y sus variantes, son muy útiles para la adición a un recipiente de fermentación durante, por ejemplo la fermentación de cerveza, debido a que la termolabilidad adecuada de la enzima que posibilita la inactivación por pasteurización.

25 Se han realizado experimentos de pasteurización de cerveza a escala de laboratorio, piloto y a escala total para evaluar la capacidad de inactivar los polipéptidos descritos en este documento en el procedimiento de elaboración de cerveza. Las pasteurizaciones a escala de laboratorio se validaron en cerveza embotellada con glucoamilasas en un pasteurizador de túnel a escala total (no se muestran los datos). MkGA I ha demostrado ser mucho más termolábil que varias otras glucoamilasas ensayadas y puede, como la única glucoamilasa ensayada, inactivarse por completo con menos de 50 unidades (PU), que es el límite superior promedio para la pasteurización de cerveza regular. La termoestabilidad de MkGA I y MkGA II ha sido previamente estudiada en tampón (Iizuka et al., (1977), J. Gen. Appl. Microbiol., 23(5): 217-230; Iizuka et al., (1978), J. Gen. Appl. Microbiol., 24: 185-192), no obstante, se observó que la estabilidad de MkGA I es inferior en comparación con una disolución tamponada. MkGA I es significativamente menos termoestable en varias clases de cervezas desgasificadas (pH 4,3-4,6) comparada con el tampón de Na-acetato 0,1M (pH 4,7) (Iizuka et al., (1977), J. Gen. Appl. Microbiol., 23(5): 217-230; Iizuka et al., (1978), J. Gen. Appl. Microbiol., 24: 185-192), lo que resulta en la inactivación completa de MkGA I en la cerveza pero no en el tampón de acetato con menos de 50 PU. La presente invención ha hallado sorprendentemente que MkGA I es lo suficientemente termolábil en cerveza como para ser completamente inactivada por pasteurización y a la vez mantener un alto desempeño durante la fermentación de la cerveza.

40 No obstante, la baja expresión de MkGA I en *Monascus kaoliang* la convierte en poco atractiva para su comercialización. Los presentes inventores han identificado además la secuencia de ADN genómico de MkGA I, incluida la secuencia del péptido de señal específico que permite la expresión heteróloga de, por ejemplo, MkGA I y MkGA II, tal como la expresión en *Trichoderma reesei*.

### 1. Definiciones

45 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el significado comúnmente comprendido por el experto en la técnica a la cual pertenece la presente descripción. Singleton et al., Dictionary of Microbiology And Molecular Biology, 2a ed., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale & Markham, The Harper Collins Dictionary Of Biology, Harper Perennial, N.Y. (1991) proporcionan al experto en la técnica el conocimiento general de los términos utilizados en este documento. Aun así, ciertos términos se definen a continuación con fines de claridad y facilidad de referencia.

50 Tal como se emplea en esta memoria, el término "glucoamilasa" (EC 3.2.1.3) se refiere a una enzima que cataliza la liberación de D-glucosa de los extremos no reductores del almidón y oligo y polisacáridos relacionados.

Tal como se emplea en esta memoria, el término "MkGA" se refiere a la mezcla de ambas variantes de glucoamilasa MkGA I y MkGA II producidas a partir de la fermentación de *Monascus kaoliang*.

55 Tal como se emplea en esta memoria, el término "MkGA I" se refiere a una variante de glucoamilasa más pequeña de *Monascus kaoliang* sin un dominio de unión a almidón (SBD).

Tal como se emplea en esta memoria, el término "MkGA II" se refiere a una variante de glucoamilasa de *Monascus kaoliang* que tiene un dominio de unión a almidón (SBD).

5 Tal como se emplea en esta memoria, una "secuencia homóloga" e "identidad de secuencia" con respecto a una secuencia de ácido nucleico o polipéptido significa que tiene por lo menos 100%, por lo menos 99%, por lo menos 98%, por lo menos 97%, por lo menos 96%, por lo menos 95%, por lo menos 94%, por lo menos 93%, por lo menos 92%, por lo menos 91%, por lo menos 90%, por lo menos 88%, por lo menos 85%, por lo menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico o secuencia de polipéptidos cuando se alinean de manera óptima para comparación, en donde la función de la secuencia de ácido nucleico o la secuencia de polipéptidos candidata es esencialmente la misma que la de la secuencia de ácido nucleico o la secuencia de polipéptidos con la que se está comparando la secuencia homóloga candidata. En algunas realizaciones, las secuencias homólogas tienen entre por lo menos aproximadamente 85% y 100% de identidad de secuencia, mientras que en otras realizaciones hay entre aproximadamente 90% y 100% de identidad de secuencia, y en otras realizaciones, hay por lo menos aproximadamente 95% y 100% de identidad de secuencia.

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

20 El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácido nucleico" o el "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" se define como el porcentaje de residuos de nucleótidos o de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que es idéntico con los residuos de nucleótidos o con los residuos de aminoácidos de la secuencia de partida. La identidad de secuencia se puede medir a lo largo de toda la secuencia de partida

25 Las secuencias homólogas se determinan por métodos conocidos de alineación de secuencias. Un método de alineación comúnmente utilizado es BLAST descrito por Altschul et al., (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990); y Karlin et al, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 5873-5787 (1993)). Un programa BLAST particularmente útil es el programa WU-BLAST-2 (véase Altschul et al, Meth. Enzymol. 266: 460-480 (1996)). WU-BLAST-2 emplea varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se configuran a los valores predeterminados. Los parámetros ajustables se configuran con los siguientes valores: tramo de superposición =1, fracción de superposición = 0,125, umbral de palabra (T) = 11. Los parámetros HSP S y HSP S2 son valores dinámicos y son establecidos por el propio programa dependiendo de la composición de la secuencia particular y de la composición de la base de datos particular contra la cual se está buscando la secuencia de interés. No obstante, los valores se pueden ajustar para incrementar la sensibilidad.

35 Un % del valor de identidad de la secuencia de aminoácidos se determina con el número de residuos idénticos compatibles dividido por el número total de residuos de la secuencia "más larga" en la región alineada. La secuencia "más larga" es la que tiene los residuos más reales en la región alineada (se ignoran las brechas introducidas por WU-Blast-2 para maximizar la puntuación de alineación).

40 Otros métodos encuentran uso en las secuencias de alineación. Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de secuencias múltiples a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineaciones progresivas en pares. También puede graficar un árbol que muestra las relaciones de agrupación utilizadas para crear la alineación. PILEUP utiliza una simplificación del método de alineación progresiva de Feng y Doolittle (Feng and Doolittle, J. Mol. Evol. 35: 351-360 (1987)). El método es similar a aquel descrito por Higgins y Sharp (Higgins and Sharp, CABIOS 5: 151-153 (1989)). Los parámetros PILEUP útiles incluyen un peso del hueco (gap) predeterminado de 3,00, un peso y longitud del hueco predeterminados de 0,10 y huecos terminales ponderados.

45 En otro aspecto, el porcentaje de identidad de una secuencia de aminoácidos con o hacia otra secuencia de aminoácidos, se determina mediante el uso de la búsqueda Blast proteína-proteína (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) con ajustes predeterminados: matriz de puntuación: blosum62, base de datos de secuencias de proteínas no redundantes y el algoritmo blast

Ajustes	Umbral esperado	10
	Compatibilidades máx en un intervalo de averiguación	0
	Penalidad de apertura del hueco	11
	Penalidad de extensión del hueco	1
	Ajuste de composición:	
	Ajuste de la matriz de puntuación de composición condicional	
	Máscara y filtros	No

El término "alineación óptima" se refiere a la alineación que proporciona la puntuación más alta del porcentaje de identidad.

Tal como se emplean en esta memoria, las expresiones "variante de glucoamilasa" o "variante" se emplean con referencia a las glucoamilasas que son similares a una secuencia de glucoamilasa (p. ej., las secuencias de glucoamilasa de *Monascus kaoliang* I y II) pero que tienen por lo menos una sustitución, eliminación o inserción en su secuencia de aminoácidos que las hace diferentes en secuencia de la glucoamilasa I y/o II. En algunos casos, han sido manipuladas y/o modificadas para incluir por lo menos una sustitución, eliminación o inserción en su secuencia de aminoácidos que las hace diferentes en cuanto a secuencia de la glucoamilasa I y/o II.

Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "dominio catalítico" se refiere a una región estructural de un polipéptido que contiene el sitio activo para la catálisis de hidrólisis de sustrato.

El término "enlazador" se refiere a una secuencia de aminoácidos corta que en general contiene entre 3 y 40 residuos de aminoácidos que unen covalentemente una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio de unión a almidón con una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio catalítico.

La expresión "dominio de unión a almidón" (SBD) se refiere a una secuencia de aminoácidos que se une preferencialmente a un sustrato de almidón. El experto en la técnica sabe cómo identificar un SBD – el SBD es un ejemplo de un módulo de unión a carbohidratos (CBM), y los CBM se han clasificado en las familias CBM usando un sistema de clasificación basado en secuencias (<http://www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.html>). A su vez, el experto en la técnica sabe aislar materiales que contienen, por ejemplo, un SBD que usa cromatografía de afinidad beta-ciclodextrina o almidón en bruto (Hamilton et al. (2000) *Enzyme and Microbial Technology* 26 pág. 561-567). En un aspecto, la definición de dominio de SBD es adoptada de la base de datos de Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/> o [www.sanger.ac.uk/resources/databases/pfam.html](http://www.sanger.ac.uk/resources/databases/pfam.html)) en la que las familias de dominios de proteínas se generan a partir de similitud de secuencias. Por lo tanto, en un aspecto, el SBD es como lo define la familia del módulo 20 de unión a carbohidratos de la base de datos de Pfam.

Tal como se emplea en esta memoria, el término "fragmento" se define como un polipéptido que tiene uno o más (varios) aminoácidos eliminados del término de aminoácidos y/o carboxilo, por ejemplo del polipéptido de la SEC ID NÚM:3 o 6; en donde el fragmento tiene actividad de glucoamilasa. En un aspecto, el fragmento tiene uno o más (varios) aminoácidos eliminados del término amino de la SEC ID NUM:3. En un aspecto, el polipéptido contiene menos residuos en el término N o C en comparación con el tipo silvestre, y en el caso de MkGA I también comparada con MkGA II.

En un aspecto, un polipéptido descrito en este documento contiene como máximo 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 495, 500, 505, 507, 515, 525, 535, 545, 555, 565 o 573 residuos de aminoácidos.

Tal como se emplea en esta memoria, el término "truncado" se refiere a un polipéptido que comparado con la proteína de tipo silvestre (u otra variante) no logra su longitud total traducida y en consecuencia carece de algunos de los aminoácidos presentes en la proteína de tipo silvestre. El truncamiento normalmente se lleva a cabo mediante mutación de terminación prematura, pero podría ser provocado por otro mecanismo – tal como una modificación post- traducción.

Tal como se emplean en esta memoria, las expresiones "secuencia mutante" y "gen mutante" se utilizan de manera intercambiable y se refieren a una secuencia de polinucleótidos que tiene una alteración en por lo menos un codón que ocurre en una secuencia madre de la célula hospedante. El producto de expresión de la secuencia mutante es una proteína variante con una secuencia de aminoácidos alterada en relación con la glucoamilasa I y/o II. El producto de expresión puede tener una capacidad funcional alterada (p. ej., actividad enzimática mejorada o mayor termoestabilidad).

El término "propiedad" o sus equivalentes gramaticales en el contexto de un polipéptido, tal como se emplea en esta memoria, se refiere a cualquier característica o atributo de un polipéptido que pueda seleccionarse o detectarse. Estas propiedades incluyen, aunque sin limitarse a ello, estabilidad oxidativa, especificidad de sustrato, actividad catalítica, estabilidad térmica, perfil de actividad de pH, resistencia a degradación proteolítica, KM, K<sub>cat</sub>, relación K<sub>cat</sub>/KM, pliegue de proteínas, capacidad de unirse a un sustrato y capacidad de ser segregado.

El término "propiedad" o su equivalente gramatical en el contexto de un ácido nucleico, tal como se emplea en esta memoria, se refiere a cualquier característica o atributo de un ácido nucleico que pueda seleccionarse o detectarse. Estas propiedades incluyen, aunque sin limitarse a ello, una propiedad que afecta la transcripción génica (p. ej., fuerza del promotor o reconocimiento del promotor), una propiedad que afecta el procesamiento de ARN (p. ej., empalme de ARN y estabilidad de ARN), una propiedad que afecta la traducción (p. ej., regulación, unión de Mrna a proteínas ribosómicas).

La expresión "térmicamente estable" y el término "termoestable" se refieren a variantes de glucoamilasa de la presente descripción que retienen una cantidad especificada de actividad enzimática después de la exposición a una temperatura durante un periodo de tiempo determinado bajo condiciones predominantes durante la hidrólisis de los sustratos de almidón, por ejemplo, mientras se exponen a temperaturas alteradas.

La expresión "estabilidad mejorada" en el contexto de una propiedad tal como termoestabilidad se refiere a una actividad catalítica de mayor retención, o a actividad hidrolítica de almidón, no obstante, medida con el transcurso del tiempo en comparación con glucoamilasa I y/o II.

5 La expresión "glucoamilasa termolábil" se refiere a una glucoamilasa de la presente descripción que pierde actividad enzimática hidrolítica detectable después de la exposición a una temperatura durante un periodo de tiempo determinado bajo condiciones predominantes durante la pasteurización del producto de un procedimiento de elaboración de cerveza. Las condiciones precisas de pasteurización (p. ej., unidades de pasteurización) dependerán del tipo de cerveza producida por el procedimiento de elaboración de cerveza. La pérdida de actividad hidrolítica detectable de la glucoamilasa termolábil en una cerveza pasteurizada se puede detectar usando un ensayo enzimático de glucoamilasa como se describe en este documento y definido por la pérdida de actividad medida por ese ensayo. Un ejemplo de una glucoamilasa termolábil es una glucoamilasa que tiene la SEC ID NÚM: 6.

10 La expresión "actividad específica" se define como la actividad por mg de proteína de glucoamilasa. En algunas realizaciones, la actividad para la glucoamilasa se determina con un ensayo de etanol y se expresa como la cantidad de glucosa que se produce a partir del sustrato de almidón. En algunas realizaciones, la concentración de proteína se puede determinar usando un ensayo Caliper.

15 El término "activo" y la expresión "biológicamente activo" se refieren a una actividad biológica asociada con una proteína particular. Por lo tanto, la actividad biológica de una proteína determinada hace referencia a cualquier actividad biológica típicamente atribuida a esa proteína por el experto en la técnica. Por ejemplo, una actividad enzimática asociada con una glucoamilasa es hidrolítica y, en consecuencia una glucoamilasa activa tiene actividad hidrolítica.

Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "actividad de glucoamilasa" se refiere a la actividad de una enzima que cataliza la liberación de D-glucosa de los extremos no reductores del almidón y oligo y polisacáridos relacionados. En particular, la actividad de glucoamilasa se puede ensayar mediante el método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (véase Goto et al., Biosci. Biotechnol. Biochem.58:49-54 (1994)).

25 Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico", utilizados intercambiabilmente en la presente memoria, hacen referencia a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, o bien ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Estos términos incluyen, aunque sin limitarse a ello, un ADN de una sola cadena, o de doble o triple cadena, ADN genómico, ADNc, ARN, híbrido ADN-ARN o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina, u otras bases de nucleótidos naturales, químicas o bioquímicas modificadas, no naturales o derivadas.

30 Tal como se emplean en esta memoria, las expresiones "constructo de ADN", "ADN de transformación" y "vector de expresión" se usan de manera intercambiable para hacer referencia a ADN utilizado para introducir secuencias en una célula hospedante u organismo. El ADN se puede generar *in vitro* por PCR o mediante cualquier otra técnica(s) adecuada conocida en la industria. El constructo de ADN, o el cassette de expresión recombinante, se puede incorporar a un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN plastidial, virus o fragmento de ácido nucleico. Habitualmente, la porción del cassette de expresión recombinante de un vector de expresión, constructo de ADN o ADN de transformación incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácido nucleico que se ha de transcribir y un promotor. En algunas realizaciones, los vectores de expresión tienen la capacidad de incorporar y expresar fragmentos de ADN heterólogos en una célula hospedante.

40 Tal como se emplea en esta memoria, el término "vector" se refiere a un constructo de polinucleótido diseñado para introducir ácidos nucleicos en uno o más tipos de células. Los vectores incluyen vectores de clonación, vectores de expresión, vectores transportadores, plásmidos, cassettes y similares.

45 Tal como se emplea en esta memoria en el contexto de introducir una secuencia de ácido nucleico en una célula, el término "introducid/a" se refiere a cualquier método adecuado para transferir la secuencia de ácido nucleico a la célula. Dichos métodos de introducción incluyen, aunque sin limitarse a ello, fusión, transfección, transformación, conjugación y transducción de protoplastos.

Tal como se emplean en esta memoria, el término "transformada" y la expresión "establemente transformada" se refieren a una célula que tiene una secuencia de polinucleótidos no natural (heteróloga) integrada en su genoma o como un plásmido episomal que se mantiene durante por lo menos dos generaciones.

50 Tal como se emplean en esta memoria, las expresiones "marcador seleccionable" y "marcador selectivo" se refieren a un ácido nucleico (p. ej., un gen) capaz de expresión en células hospedantes para facilidad de selección de esos hospedantes que contienen el vector. Típicamente, los marcadores seleccionables son genes que confieren resistencia antimicrobiana o una ventaja metabólica en la célula hospedante para permitir que las células que contienen ADN exógeno se distingan de las células que no han recibido ninguna secuencia exógena durante la transformación.

55 Tal como se emplea en esta memoria, el término "promotor" hace referencia a una secuencia de ácido nucleico que funciona para dirigir la transcripción de un gen en dirección 3'. El promotor, junto con otras secuencias de ácido nucleico reguladoras de transcripción y traducción (también denominadas "secuencias de control") es necesario para

expresar un gen determinado. En general, las secuencias reguladoras de transcripción y traducción incluyen, aunque sin limitarse a ello, secuencias promotoras, sitios de unión al ribosoma, secuencias de inicio y cese de la transcripción, secuencias de inicio y cese de la traducción, y secuencias mejoradoras o activadoras.

5 Un ácido nucleico está "operativamente unido" cuando está dispuesto en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN que codifica un líder segregador (es decir, un péptido de señal), puede unirse operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participó en la segregación del polipéptido. En general, "operativamente unido" significa que las secuencias de ADN que están siendo unidas son contiguas, y, en el caso de un líder segregador, contiguas y en fase de lectura.

10 Tal como se emplea en esta memoria, el término "gen" se refiere a un polinucleótido (p. ej., un segmento de ADN), que codifica un polipéptido e incluye regiones precedentes y posteriores a las regiones codificantes, así como también secuencias intervinientes (intrones) entre los segmentos codificantes individuales (exones).

15 Tal como se emplea en esta memoria, "ortólogo" y "genes ortólogos" se refieren a genes en distintas especies que han evolucionado de un gen ancestral común (es decir, un gen homólogo) por especiación. Típicamente, los ortólogos retienen la misma función durante el transcurso de la evolución. La identificación de ortólogos encuentra uso en la predicción confiable de la función del gen en genomas recientemente secuenciados.

20 Tal como se emplean en esta memoria, "parálogo" y "genes parálogos" se refieren a genes que están relacionados por duplicación dentro de un genoma. Mientras que los ortólogos retienen la misma función a través del curso de la evolución, los parálogos evolucionan nuevas funciones, aunque algunas funciones a menudo se relacionan con la original. Los ejemplos de genes parálogos incluyen, aunque sin limitarse a ello, genes que codifican tripsina, quimiotripsina, elastasa y trombina, todas serina proteinasas que ocurren dentro de las mismas especies.

Tal como se emplea en esta memoria, el término "hibridación" se refiere al proceso mediante el cual una cadena de ácido nucleico se une con una cadena complementaria través de pares de bases, como se conoce en la técnica.

25 Una secuencia de ácido nucleico se considera "selectivamente hibridable" a una secuencia de ácido nucleico de referencia si las dos secuencias se hibridan específicamente una a la otra bajo condiciones de hibridación y lavado de rigurosidad moderada a alta. Las condiciones de hibridación se basan en la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del complejo de unión a ácido nucleico o sonda. Por ejemplo, la "rigurosidad máxima" comúnmente ocurre a aproximadamente  $T_m - 5^\circ\text{C}$  ( $5^\circ\text{C}$  debajo del  $T_m$  de la sonda); la "alta rigurosidad" a aproximadamente  $5-10^\circ\text{C}$  debajo del  $T_m$ ; la "rigurosidad intermedia" a aproximadamente  $10-20^\circ\text{C}$  debajo del  $T_m$  de la sonda; y la "baja rigurosidad" a aproximadamente  $20-25^\circ\text{C}$  debajo del  $T_m$ . Funcionalmente, se pueden usar condiciones de rigurosidad máximas para identificar secuencias que tengan identidad estricta o prácticamente estricta con la sonda de hibridación; aunque se puede utilizar una hibridación de rigurosidad intermedia o baja para identificar o detectar homólogos de secuencias de polinucleótidos.

35 Las condiciones de hibridación de rigurosidad moderada y alta se conocen en la técnica. Un ejemplo de condiciones alta rigurosidad incluye hibridación a aproximadamente  $42^\circ\text{C}$  en 50% formamida, 5 x SSC, 5 x disolución de Denhardt, 0,5% SDS y 100 mg/ml ADN de vehículo desnaturalizado seguido de lavado dos veces en 2 x SSC y 0,5% SDS a temperatura ambiente y dos veces más en 0,1 x SSC y 0,5% SDS a  $42^\circ\text{C}$ . Un ejemplo de condiciones rigurosas moderadas incluye una incubación durante la noche a  $37^\circ\text{C}$  en una disolución que comprende 20% formamida, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x disolución de Denhardt, 10% sulfato de dextrano y 20 mg/ml ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado, seguido de lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente  $37-50^\circ\text{C}$ . Los expertos en la técnica saben cómo ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. según sea necesario para acomodar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

45 Tal como se emplea en esta memoria, "recombinante" incluye la referencia a una célula o vector, que se ha modificado por la introducción de una secuencia de ácido nucleico heteróloga u homóloga, o que la célula deriva de una célula modificada de este modo. Por consiguiente, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en forma idéntica dentro de la forma natural (no recombinante) de la célula o expresan genes naturales que se expresan anormalmente de otra manera, se expresan en bajo grado o no se expresan en absoluto como consecuencia de la intervención humana intencional.

50 En una realización, las secuencias de ADN mutadas se generan con mutagénesis de saturación del sitio en por lo menos un codón y/o nucleótido. En otra realización, la mutagénesis de saturación del sitio se realiza para dos o más codones. En otra realización, las secuencias de ADN mutante tienen más de aproximadamente 50%, más de 55%, más de 60%, más de 65%, más de 70%, más de 75%, más de 80%, más de 85%, más de 90%, más de 95% o más de 98% de identidad con la secuencia de ADN de glucoamilasa I y/o II. En realizaciones alternativas, el ADN mutante se puede generar *in vivo* usando cualquier procedimiento mutagénico conocido tal como, por ejemplo, radiación, nitrosoguanidina y similares. La secuencia de ADN deseada puede luego aislarse y usarse en los métodos provistos en la presente memoria.

Tal como se emplea en esta memoria, "proteína heteróloga" hace referencia a una proteína o polipéptido que no ocurre naturalmente en la célula hospedante.

Una enzima se "sobre-expresa" en una célula hospedante si la enzima se expresa en la célula a un nivel superior al nivel en el cual se expresa en una célula de tipo silvestre correspondiente.

Los términos "proteína" y "polipéptido" se usan de manera intercambiable en este documento. En la presente descripción y en las reivindicaciones, se utilizan los códigos convencionales de una letra y de tres letras para los residuos de aminoácidos. El código de 3 letras para los aminoácidos se define de conformidad con la Comisión Conjunta sobre Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB (IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, JCBN). También se entiende que un polipéptido puede estar codificado por más de una secuencia de nucleótidos debido a la degeneración del código genético.

Las variantes de la descripción se describen mediante la siguiente nomenclatura: [residuo de aminoácido original/posición/residuo de aminoácido sustituido]. Por ejemplo, la sustitución de leucina para arginina en la posición 76 se representa como R76L. Cuando una posición adecuada para sustitución se identifica en este documento sin un aminoácido específico sugerido, se ha de entender que el residuo de aminoácido en la posición puede ser sustituido por cualquier residuo de aminoácido.

"Pro-secuencia" es una secuencia de aminoácidos entre la secuencia de señal y la proteína madura que es necesaria para la segregación de la proteína. La escisión de la pro-secuencia resultará en una proteína activa madura.

El término forma "precursora" de una proteína o péptido se refiere a una forma madura de la proteína que tiene una pro-secuencia operativamente unida al término amino o carbonilo de la proteína. El precursor puede también tener una secuencia de "señal" operativamente unida al término amino de la pro-secuencia. El precursor puede también tener polinucleótidos adicionales implicados en actividad post-traducción (p. ej., polinucleótidos escindidos de allí para dejar la forma madura de una proteína o péptido).

"Cepa hospedante" o "célula hospedante" se refiere a un hospedante adecuado para un vector de expresión que comprende ADN de acuerdo con la presente descripción.

Las expresiones "derivado de" y "obtenido de" se refieren no solamente a una glucoamilasa producida o producible por una cepa del organismo en cuestión, sino también a una glucoamilasa codificada por una secuencia de ADN aislada de dicha cepa y producida en un organismo hospedante que contiene dicha secuencia de ADN. Adicionalmente, el término se refiere a una glucoamilasa codificada por una secuencia de ADN de origen sintético y/o ADNc y que tiene las características de identificación de la glucoamilasa en cuestión.

Un "derivado" dentro del alcance de la presente invención de esta definición en general retiene la actividad característica de hidrolización observada en la glucoamilasa I y/o II al grado tal que el derivado es útil para propósitos similares a la forma silvestre, natural o madre. Los derivados funcionales de glucoamilasas abarcan péptidos naturales, sintéticos o recombinantes o fragmentos de péptidos que tienen las características generales de las glucoamilasas de la presente descripción.

El término "aislado" se refiere a un material que es eliminado del entorno natural si ocurre naturalmente. Una proteína "purificada" se refiere a una proteína que es por lo menos parcialmente purificada hasta homogeneidad. En algunas realizaciones, una proteína purificada puede ser más de aproximadamente 10% pura, opcionalmente más de aproximadamente 20% pura y opcionalmente más de aproximadamente 30% pura, según lo determinado por SDS-PAGE. Otros aspectos de la descripción abarcan la proteína en una forma altamente pura (es decir, más de aproximadamente 40% pura, más de aproximadamente 60% pura, más de aproximadamente 80% pura, más de aproximadamente 90% pura, más de aproximadamente 95% pura, más de aproximadamente 97% pura e incluso más de aproximadamente 99% pura), según lo determinado por SDS-PAGE.

Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "mutagénesis combinatoria" se refiere a métodos en los que se generan bibliotecas de variantes de una secuencia de partida. En estas bibliotecas, las variantes contienen una o varias mutaciones seleccionadas de un conjunto de mutaciones predefinidas. A su vez, los métodos proporcionan medios para introducir mutaciones aleatorias que no eran miembros del conjunto de mutaciones predefinidas. En algunas realizaciones, los métodos incluyen aquellos expuestos en la patente estadounidense núm. 6.582.914, incorporada a la presente memoria por referencia. En realizaciones alternativas, los métodos de mutagénesis combinatoria abarcan kits comercialmente disponibles (p. ej., QuikChange® Multisite, Stratagene, San Diego, CA).

Tal como se emplea en esta memoria, el término "composición" se refiere a una preparación en la forma de, por ejemplo, una bebida o alimento o ingrediente de pienso preparado de acuerdo con la presente invención, y puede tener la forma de una disolución o un sólido – dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración. La forma sólida puede ser o bien un polvo enzimático seco o una enzima granulada. La composición puede comprender un polipéptido de acuerdo con la invención, un vehículo de enzima y opcionalmente un estabilizante y/o conservante. El vehículo de enzima se puede seleccionar del grupo que consiste en glicerol o agua. La preparación puede comprender un estabilizante. El estabilizante se puede seleccionar del grupo que consiste en sales inorgánicas, polioles, azúcares y sus combinaciones. Además, el estabilizante puede ser una sal inorgánica tal como cloruro de potasio. En otro aspecto, el poliol es glicerol, propilenglicol o sorbitol. El azúcar es un carbohidrato de moléculas pequeñas, en particular cualquiera de los varios endulzantes de sabor como glucosa, fructosa y

sacarosa. Incluso en otro aspecto, la preparación puede comprender un conservante. En un aspecto, el conservante es metil parabeno, propil parabeno, benzoato, sorbato u otro conservante aprobado como alimento, o una mezcla de los mismos.

5 En el presente contexto, el término "fermentación" se refiere a proveer una composición tal como una bebida fermentada y/o sustancia desarrollando microorganismos en un cultivo. En el contexto de producción de enzimas (p. ej., glucoamilasa), el término "fermentación" se refiere a un proceso que implica la producción de la enzima en un proceso de cultivo microbiano. En el contexto de elaboración de cerveza, el término "fermentación" se refiere a la transformación de azúcares en un mosto, por enzimas en la levadura de la elaboración de cerveza, en etanol y dióxido de carbono con la formación de otros productos secundarios de fermentación.

10 Tal como se emplea en esta memoria, el "proceso para producción de una bebida fermentada" tal como cerveza comprende en general una etapa de preparar un empaste tal como en base a una molienda, filtrar el empaste para obtener un mosto y cebadillas, y fermentar el mosto para obtener una bebida fermentada.

15 Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "material vegetal que contiene almidón y/o azúcar" se refiere a material vegetal que contiene almidón y/o azúcar derivable de cualquier planta y parte de planta, incluidos tubérculos, raíces, tallos, hojas y semillas. "Material vegetal que comprende almidón y/o azúcar" puede ser, p. ej., uno o más cereales, tales como cebada, trigo, maíz, centeno, sorgo, mijo o arroz, y cualquiera de sus combinaciones. El material vegetal que comprende almidón y/o azúcar se puede procesar, p. ej., molerse, maltearse, maltearse parcialmente o desmaltearse. El cereal desmalteado también se denomina "grano en bruto". Los ejemplos de material vegetal que contiene almidón sin cereal comprenden, p. ej., tubérculos.

20 Tal como se emplea en esta memoria, el término "molienda" se refiere a cualquier material vegetal procesado que contiene almidón y/o azúcar adecuado para convertir en empaste. La molienda, tal como se contempla en este documento, puede comprender cualquier material vegetal que contiene almidón y/o azúcar derivable de cualquier planta o parte de planta, incluidos tubérculos, raíces, tallos, hojas y semillas. Los ejemplos de procesamiento comprenden trituración y/o molturación, que usualmente proporciona un material que es más grueso que la harina.

25 En el presente contexto, la molienda puede comprender material procesado de granos, tales como granos de cebada, trigo, centeno, avena, maíz, milo, mijo y sorgo, y más preferiblemente, por lo menos 10%, o más preferiblemente por lo menos 15%, incluso más preferiblemente por lo menos 25%, o lo más preferiblemente por lo menos 35%, tal como por lo menos 50%, por lo menos 75%, por lo menos 90% o incluso 100% (p/p) de la molienda del mosto derivado del grano. En algunas realizaciones, el mosto puede comprender el material vegetal que

30 contiene almidón y/o azúcar obtenido de raíces de mandioca [*Manihot esculenta*]. La molienda puede comprender grano malteado, tal como malta de cebada. Preferiblemente, por lo menos 10%, o más preferiblemente por lo menos 15%, incluso más preferiblemente por lo menos 25%, o lo más preferiblemente por lo menos 35%, tal como por lo menos 50%, por lo menos 75%, por lo menos 90% o incluso 100% (p/p) de la molienda del mosto deriva de grano malteado.

35 Tal como se emplea en esta memoria, el término "malta" se entiende como cualquier grano de cereal malteado, tal como cebada o trigo malteado.

En un aspecto, cuando se usa malta producida principalmente de variedades seleccionadas de cebada en relación con la producción de cerveza, la malta tiene el mayor efecto sobre el carácter y la calidad general de la cerveza. Primero, la malta es el agente de sabor principal en la cerveza. Segundo, la malta provee la porción principal del

40 azúcar fermentable. Tercero, la malta provee las proteínas, que contribuirán al cuerpo y el carácter de espuma de la cerveza. Cuarto, la malta proporciona actividades enzimáticas durante el empastado, opcionalmente complementadas por adición de enzimas exógenas. Quinto, las cebadillas de la malta proporcionan un medio de filtración para la separación del mosto después del empastado – típicamente separando los residuos o filtrando el empaste.

45 Tal como se emplea en esta memoria, el término "auxiliar" se refiere a cualquier material vegetal que contiene almidón y/o azúcar que no es malta de cebada. Como ejemplos de auxiliares, se pueden mencionar materiales tales como sémola de maíz, sémola de maíz refinada, levadura cervecera molida, arroz, sorgo, almidón de maíz refinado, cebada, almidón de cebada, cebada descascarillada, trigo, almidón de trigo, cereal torrefacto, copos de cereal, centeno, avena, patata, tapioca y jarabes, tales como jarabe de maíz, jarabe de caña de azúcar, jarabe de azúcar

50 invertida, jarabes de cebada y/o trigo, y similares se pueden usar como fuente de almidón. El almidón eventualmente se convertirá en dextrinas y azúcares fermentables. En un aspecto, "auxiliar" incluye el material vegetal que contiene almidón y/o azúcar obtenido de raíces de mandioca [*Manihot esculenta*].

Tal como se emplea en esta memoria, el término "empaste" se refiere a una suspensión acuosa de cualquier

55 material vegetal que contenga almidón y/o azúcar tal como una molienda, p. ej., que comprende malta de cebada machacada, cebada machacada y/u otro auxiliar o sus combinaciones, mezclado con agua para ser separado posteriormente en mosto y cebadillas.

Tal como se emplea en esta memoria, el término "mosto" se refiere al licor no fermentado después de extraer la molienda durante el empastado.

Tal como se emplea en esta memoria, el término "cebadillas" se refiere a los sólidos drenados cuando la molienda ha sido extraída y el mosto se separa del empaste. Las "cebadillas" se pueden usar, p. ej., como pienso.

5 Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "recuperación del extracto" en el mosto se refiere a la suma de sustancias solubles extraídas de la molienda (malta y/o auxiliares) expresada en porcentaje en base a la materia seca.

Tal como se emplea en esta memoria, el término "lúpulos" se refiere a su uso en contribuir significativamente a la cantidad de la cerveza, incluido el sabor. En particular, los lúpulos (o constituyentes de lúpulos) añaden sustancias amargas deseables a la cerveza. Además, los lúpulos pueden actuar como precipitantes de proteínas, establecer conservantes y auxiliar en la formación y estabilización de la espuma.

10 Tal como se emplean en esta memoria, el término "bebida(s)" y la expresión "producto de bebida(s)" incluye cervezas tales como cerveza totalmente malteada, cerveza fabricada bajo "Reinheitsgebot", cerveza inglesa (ale), IPA, lager, bitter, Happoshu (segunda cerveza), tercera cerveza, cerveza seca, cerveza sin alcohol, cerveza ligera, cerveza con bajo contenido de alcohol, cerveza de bajas calorías, porter, bock, stout, licor de malta, cerveza no  
15 también incluye bebidas de cereal y malta alternativas tales como bebidas de malta saborizadas con frutas, p. ej., bebidas de malta saborizadas con cítricos tales como limón, naranja, lima o fresa, bebidas de malta saborizadas con licores, p. ej., licor de malta saborizado con vodka, ron o tequila, o bebidas de malta saborizadas con café, tales como licor de malta saborizado con cafeína, y similares. En otro aspecto, la bebida o el producto de bebida es una  
20 bebida alcohólica o no alcohólica, tal como una bebida a base de cereal o malta como cerveza o whisky, tal como vino, cidra, vinagre, vino de arroz, salsa de soya o jugo.

Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "bebida de malta" incluye bebidas de malta como cerveza totalmente malteada, ale, IPA, lager, bitter, Happoshu (segunda cerveza), tercera cerveza, cerveza seca, cerveza sin alcohol, cerveza ligera, cerveza con bajo contenido de alcohol, cerveza de bajas calorías, porter, bock, stout, licor de malta, licor de malta no alcohólico y similares. La expresión "bebidas de malta" también incluye bebidas de malta  
25 alternativas tales como bebidas de malta saborizadas con frutas, p. ej., bebidas de malta saborizadas con cítricos tales como limón, naranja, lima o fresas, bebidas de malta saborizadas con licor, p. ej., licor de malta saborizado con vodka, ron o tequila, o bebidas de malta saborizadas con café, tales como licor de malta saborizado con cafeína, y similares.

30 En el contexto de la presente invención, el término "cerveza" abarca cualquier mosto fermentado, producido por fermentación/proceso de fabricación de cerveza de un material vegetal que contiene almidón, por lo tanto, en particular también cerveza producida exclusivamente a partir de malta o un auxiliar, o cualquier combinación de malta y un auxiliar.

35 La cerveza se puede elaborar a partir de una variedad de material vegetal que contiene almidón y/o azúcar, a menudo granos de cereales y/o malta, esencialmente mediante el mismo procedimiento. Se cree que los almidones de granos son homopolímeros de glucosa en donde los residuos de glucosa están enlazados por enlaces o bien alfa-1, 4- o alfa-1,6, siendo el primero el predominante.

Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "cerveza Pilsner" se refiere a una cerveza pale lager fermentada en el fondo (elaborada a partir de malta Pilsner) usualmente con un carácter de lúpulo más pronunciado que las cervezas de tipo pale lager normales (p. ej., helles).

40 Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "cervezas ligeras, cervezas reducidas en calorías o cervezas de bajas calorías", se refiere a la gran popularización reciente de bebidas elaboradas, particularmente en el mercado estadounidense. Como se define en EE.UU., estas cervezas altamente atenuadas tienen aproximadamente 30% menos calorías que la cerveza "normal" de un fabricante".

45 Tal como se emplean en esta memoria, la expresión "cerveza no alcohólica" o la expresión "cerveza con bajo contenido de alcohol" se refiere a una cerveza que contiene un máximo de 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5% de alcohol en volumen. La cerveza no alcohólica puede ser elaborada por métodos especiales (fermentación detenida), con "levaduras" especiales que no producen alcohol I por métodos tradicionales, pero en los cuales, durante las etapas finales del proceso de fabricación, el alcohol es extraído, p. ej., por evaporación al vacío, aprovechando los distintos puntos de ebullición del agua y el alcohol.

50 Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "cerveza de bajas calorías" o "cerveza con bajo contenido de carbohidratos" se define como una cerveza con un contenido de carbohidratos de 0,75 g/100 g o menos y con un grado de fermentación de alrededor de 90-92%.

55 Tal como se emplea en esta memoria, el término "pasteurización" significa inactivar los microorganismos en disolución acuosa por calentamiento. La implementación de la pasteurización en el proceso de elaboración de cerveza se realiza habitualmente a través del uso de un pasteurizador flash o pasteurizador de túnel. Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "unidades de pasteurización o PU" se refiere a una medida cuantitativa de la

pasteurización. Una unidad de pasteurización (1 PU) para cerveza se define como una retención del calor de un minuto a 60 grados Celsius. Uno calcula que:

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

en donde:

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

T = temperatura, en grados Celsius, en el pasteurizador

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

Se pueden usar distintas PU mínimas dependiendo del tipo de cerveza, materia prima y contaminación microbiana, cervecero y efecto percibido del sabor de la cerveza. Típicamente, para pasteurización de cerveza, se requieren 14 - 15 PU. Dependiendo del equipo de pasteurización, las temperaturas de pasteurización estarán típicamente en el intervalo de 64 - 72 grados Celsius con un tiempo de pasteurización calculado de manera acorde. Se puede hallar más información en "Technology Brewing and Malting" de Wolfgang Kunze del Research and Teaching Institute of Brewing, Berlin (VLB), 3era edición completamente actualizada, 2004, ISBN 3-921690-49-8.

Si se provee un intervalo de valores, se entiende que cada valor interviniente, hasta el décimo de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto dicte daramente lo contrario, entre los límites superior e inferior del intervalo también se describe específicamente. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor especificado o valor interviniente en un intervalo especificado y cualquier otro valor especificado o interviniente en ese intervalo especificado se abarca dentro de la descripción. Los límites superior e inferior de esos intervalos más pequeños pueden incluirse o excluirse independientemente en el intervalo, y cada intervalo en el que o bien alguno, ninguno o ambos límites se incluyen en intervalos más pequeños está también abarcado dentro de la descripción, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo especificado. Si el intervalo especificado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen alguno de los límites inducidos o ambos también se incluyen en la descripción.

Antes de que las realizaciones ilustrativas se describan en más detalle, se ha de entender que esta descripción no se limita a realizaciones particulares descritas, ya que estas pueden, por supuesto, variar. Si bien cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en la presente memoria se puede usar en la práctica o ensayos de la presente descripción, se describen ahora métodos y materiales ilustrativos.

Tal como se emplean en esta memoria y en las reivindicaciones anejas, las formas en singular "un", "una" y "el", "la" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un gen" incluye una pluralidad de dichos agentes candidatos y la referencia a "la célula" incluye la referencia a una o más células y sus equivalentes conocidos en la técnica, etc.

Las publicaciones analizadas en este documento se ofrecen solamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Lo expuesto en este documento no deberá ser interpretado como una admisión de que la presente descripción no está autorizada a retrotraer dicha publicación en virtud de la invención previa.

## 2. Abreviaturas

GA	glucoamilasa
GAU	unidad de glucoamilasa
% en peso	porcentaje en peso
40 °C	grados centígrados
rpm	revoluciones por minuto
aa o AA	aminoácido
bp	par de base
kb	par de kilobase
45 kD	kilodaltons
g o gm	gramos
µg	microgramos

## ES 2 616 917 T3

	mg	miligramos
	ml y mL	microlitros
	ml y mL	mililitros
	mm	milímetros
5	μm	micrómetro
	M	molar
	mM	milimolar
	μM	micromolar
	U	unidades
10	V	voltios
	PM	peso molecular
	seg(s) o s(s)	segundo/segundos
	min(s) o m(s)	minuto/minutos
	hr(s) o h(s)	hora/horas
15	DO	oxígeno disuelto
	ABS	Absorbancia
	EtOH	etanol
	PSS	disolución salina fisiológica
	m/v	masa/volumen
20	MTP	placa de microtitulación
	N	Normal
	DP1	monosacáridos
	DP2	disacáridos
	DP>3	oligosacáridos, azúcares que tienen un grado de polimerización mayor que 3
25	ppm	partes por millón
	SBD	dominio de unión a almidón
	CD	dominio catalítico
	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
	WT	tipo silvestre
30	RDF	Grado real de atenuación
	SG	Gravedad específica
	PU	Unidades de pasteurización
	MkGA I	glucoamilasa I de <i>Monascus kaoliang</i>
	MkGA II	glucoamilasa II de <i>Monascus kaoliang</i>
35	<i>H. jecorina</i>	<i>Hypocrea jecorina</i>
	<i>T. reesei</i>	<i>Trichoderma reesei</i>

AnGA *Aspergillus Niger*3. Glucoamilasa derivada de *monascus kaoliang*

Se describe en este documento un polipéptido aislado que tiene actividad de glucoamilasa seleccionada del grupo que consiste en:

- 5 a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el polipéptido maduro de las SEC ID NÚM: 3 y 6;
- b) un polipéptido codificado por i) la secuencia de ácido nucleico comprendida en la SEC ID NÚM:1 o la SEC ID NÚM:4, o ii) la secuencia de ADNc de i), o iii) la secuencia de SEC ID NÚM:2 o SEC ID NÚM:5; o iv) por un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones de por lo menos baja rigurosidad con la cadena de complementariedad de i), ii) o iii);
- 10 c) un polipéptido que comprende una sustitución, eliminación y/o inserción conservadora de uno o más aminoácidos de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el polipéptido maduro de las SEC ID NÚM: 3 y 6;
- 15 d) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID NÚM: 3 o 6; y
- e) un fragmento de un polipéptido de a), b), c) o d) que tiene actividad de glucoamilasa.

En un aspecto, el polipéptido contemplado en la presente memoria se obtiene por expresión recombinante en una célula hospedante. En otro aspecto, el polipéptido contemplado en este documento no tiene un dominio de unión al almidón.

Otro aspecto se refiere a la caracterización de glucoamilasa(s) de *Monascus kaoliang*. Las glucoamilasas consisten en tanto como tres dominios estructurales distintos, incluido un dominio catalítico de aproximadamente 450 residuos que está estructuralmente conservado, que está en general seguido de una región enlazadora que consiste en 30 y 80 residuos, que están a su vez conectados a un dominio de unión a almidón de aproximadamente 100 residuos. Se ha descubierto que *Monascus kaoliang* produce dos formas de glucoamilasa, ilustradas en este documento como glucoamilasa I y II (Iizuka et al., (1977), J. Gen. Appl. Microbiol., 23(5): 217-230; Iizuka et al., (1978), J. Gen. Appl. Microbiol., 24: 185-192). Como se caracteriza en la presente invención, la glucoamilasa I (MkGA I) tiene la secuencia de aminoácidos anexa al presente documento como SEC ID NÚM: 6, la secuencia de ADN genómico relacionada que codifica glucoamilasa I (incluida la secuencia del péptido de señal identificada), anexa a este documento como SEC ID NÚM:4 y la secuencia de ADNc relacionada que codifica glucoamilasa I, anexa a este documento como SEC ID NÚM:5. Además, la glucoamilasa II (MkGA II) se caracteriza en este documento por tener la secuencia de aminoácidos anexa a este documento como SEC ID NÚM:3, la secuencia de ADN genómico relacionada que codifica la glucoamilasa II (incluida la secuencia del péptido de señal identificada), anexa a este documento como SEC ID NÚM:1 y la secuencia de ADNc relacionada que codifica glucoamilasa II, anexa a este documento como SEC ID NÚM:2. Los resultados de un análisis de secuencias de estos fragmentos de ADNc de glucoamilasa demostraron que hubo dos variantes distintas de glucoamilasa. Una primera variante más larga, denominada en este documento glucoamilasa II, que codifica glucoamilasa con un dominio de unión a almidón (SBD), y una segunda variante más corta, denominada en este documento glucoamilasa I, que codifica una glucoamilasa sin un SBD. La diferencia entre las dos variantes es un hueco de 162 pares de bases al final de la región enlazadora que separa el núcleo catalítico y el SBD. La proteína MkGA I madura contiene 480 residuos (SEC ID NÚM: 6) comparada con la proteína MkGA II madura que tiene 581 residuos (SEC ID NÚM: 3). Las dos proteínas son altamente similares y en una alineación sin huecos, difieren en las siguientes 8 posiciones: 459, 473, 474, 475, 476, 477, 479 y 480. En estas posiciones, la composición de los aminoácidos es la siguiente: MkGA I: A459, C473, A474, A475, T476, P477, A479 y V480, y MkGA II: P459, S473, R474, P475, Y476, G477, G479 y R480. En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido descrito en este documento en donde la secuencia de aminoácidos comprende por lo menos uno o más residuos de aminoácidos seleccionados entre los siguientes grupos: un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en A y P en la posición correspondiente a 459 en la SEC NÚM: 3 o 6, un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en C y S en la posición correspondiente a 473 en la SEC ID NÚM: 3 o 6, un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en A y R en una posición correspondiente a 474 en la SEC ID NÚM: 3 o 6, un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en A y P en una posición correspondiente a la posición 475 en la SEC ID NÚM: 3 o 6, un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en T y Y en una posición correspondiente a la posición 476 en las SEC ID NÚM: 3 o 6, un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en P y G en una posición correspondiente a la posición 477 en las SEC ID NÚM: 3 o 6, un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en A y G en una posición correspondiente a la posición 479 en la SEC ID NÚM: 6 y/o un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en V y R en una posición correspondiente a la posición 480 en las SEC ID NÚM: 3 o 6.

En un aspecto, el polipéptido descrito en este documento es un polipéptido en el que la secuencia de aminoácidos tiene por lo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NÚM: 6. En otro aspecto, el polipéptido descrito en este documento comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NÚM: 3 o 6, o su fragmento que

5

tiene actividad de glucoamilasa.

En un aspecto, el polipéptido descrito en este documento tiene una actividad de glucoamilasa (GAU) de por lo menos 0,05 GAU/mg, 0,1 GAU/mg, 0,2 GAU/mg, 0,3 GAU/mg, 0,4 GAU/mg, 0,5 GAU/mg, 0,6 GAU/mg, 0,7 GAU/mg, 0,8 GAU/mg, 0,9 GAU/mg, 1 GAU/mg, 2 GAU/mg, 3 GAU/mg, 5 GAU/mg o 10 GAU/mg.

10

En otro aspecto el polipéptido descrito en este documento tiene una actividad de glucoamilasa (GAU) de 0,05-10 GAU/mg, tal como 0,1-5 GAU/mg, tal como 0,5-4 GAU/mg, tal como 0,7-3 GAU/mg o tal como 1-3 GAU/mg.

Incluso en otro aspecto, el polipéptido descrito en este documento comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEC ID NÚM:3 o 6.

15

En una realización, la glucoamilasa I o II esencialmente purificada se puede producir a partir de cepas de tipo silvestre, naturales o no modificadas de *Monascus kaoliang*, que pueden proporcionar una glucoamilasa no producida por GMO.

20

Otro aspecto se refiere a polinucleótidos aislados que codifican glucoamilasa I o II de *Monascus kaoliang*, o cualquiera de sus variantes, de modo tal que las sustituciones, eliminaciones o inserciones de nucleótidos codifiquen una forma alternativa de glucoamilasa que mantenga las características bioquímicas de la glucoamilasa I o II, u otra glucoamilasa hospedante. Los polinucleótidos se pueden preparar mediante técnicas establecidas conocidas en la industria. Los polinucleótidos se pueden preparar sintéticamente, tal como mediante un sintetizador de ADB automático. La secuencia de ADN puede ser de origen genómico mixto (o ADNc) y de origen sintético preparada ligando los fragmentos entre sí. Los polinucleótidos también se pueden preparar por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos. En general, se hace referencia a dichas técnicas en Minshull J. et al., Methods 32(4):416-427 (2004). El ADN también puede ser sintetizado por una serie de empresas comerciales tales como Geneart AG, Regensburg, Alemania.

25

Otra realización importante proporciona polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos (i) que tiene por lo menos 50% de identidad con las SEC ID NÚM: 1, 2, 4 o 5, incluyendo por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95% y por lo menos 99%, o (ii) es capaz de hibridarse a una sonda derivada de la secuencia de nucleótidos expuesta en las SEC ID NÚM: 1, 2, 4 o 5, bajo condiciones de rigurosidad intermedia a alta, o (iii) es complementaria a una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en las SEC ID NÚM: 1, 2, 4 o 5. Las sondas útiles de acuerdo con la descripción pueden incluir por lo menos 50, 100, 150, 200, 250, 300 o más nucleótidos contiguos de las SEC ID NÚM: 1, 2, 4 o 5.

30

Estos polinucleótidos aislados pueden codificar las glucoamilasas como se contempla en este documento que comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 93%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID NÚM: 3 o 6. Se proveen vectores de expresión que pueden comprender cualquiera de los polinucleótidos descritos en ese documento. También se describen fragmentos (es decir, porciones) del ADN que codifica las glucoamilasas variantes provistas en este documento. Estos fragmentos encuentran uso en la obtención de fragmentos de ADN de longitud parcial capaces de usarse para aislar o identificar polinucleótidos que codifican las enzimas de glucoamilasa descritas en esta memoria.

35

40

Incluso en otra realización, una variante de glucoamilasa se puede insertar en el organismo, tal como una variante que tiene termoestabilidad alterada, tal como termoestabilidad superior y/o actividad específica mejorada.

45

La conservación de la estructura en la molécula de glucoamilasa se correlaciona con la conservación de la actividad y el mecanismo de acción conservado para todas las glucoamilasas. Dada esta alta homología, las variantes de glucoamilasas específicas del sitio que se contemplan en este documento pueden resultar en la función alterada, y se espera que tengan consecuencias estructurales y por lo tanto funcionales similares en otras variantes de glucoamilasa.

50

Las variantes de glucoamilasa, como se contempla en la presente memoria, pueden tener sustituciones de aminoácidos en posiciones que son "equivalentes" a los residuos identificados particulares en glucoamilasa I o II de *Monascus kaoliang* (SEC ID NÚM: 6 y 3, respectivamente).

55

La "identidad estructural" determina si los residuos de aminoácidos son equivalentes. La identidad estructural es un equivalente topológico uno a uno cuando las dos estructuras (estructuras de aminoácidos tridimensionales) están alineadas. Una posición de residuos (aminoácido) de una glucoamilasa es "equivalente" a un residuo de glucoamilasa de *Monascus kaoliang* si es homóloga (es decir, correspondiente en posición en estructura primaria o terciaria) o análoga a un residuo específico o porción de ese residuo en glucoamilasa de *Monascus kaoliang* (que tiene la misma capacidad funcional o una similar para combinarse, reaccionar o interactuar químicamente).

Para establecer identidad con la estructura primaria, la secuencia de aminoácidos de una glucoamilasa particular se puede comparar directamente con la secuencia de glucoamilasa I o II de *Monascus kaoliang*, y particularmente con un conjunto de residuos conocidos por ser invariantes en las glucoamilasas por cuya secuencia se conocen. Después de alinear los residuos conservados, permitiendo las inserciones y eliminaciones necesarias con el fin de mantener la alineación (es decir, evitar la eliminación de residuos conservados a través de eliminación e inserción arbitrarias), se definen los residuos equivalentes a aminoácidos particulares en la secuencia primaria de glucoamilasa de *Monascus kaoliang*. Los residuos equivalentes se pueden definir por 100% de conservación con glucoamilasa I o II de *Monascus kaoliang*. No obstante, la alineación mayor que 75% o de tan solo 50% de los residuos conservados también puede ser adecuada para definir residuos equivalentes, particularmente cuando se incluye la alineación basada en la identidad estructural.

La identidad estructural implica la identificación de residuos equivalentes entre las dos estructuras. Los "residuos equivalentes" se pueden definir determinando la homología al nivel de la estructura terciaria (identidad estructural) para una enzima cuya estructura terciaria se ha determinado por cristalografía de rayos X. Los residuos equivalentes se definen como aquellos para los cuales las coordenadas atómicas de dos o más de los átomos de cadena principal de un residuo de aminoácidos de glucoamilasa de *Monascus kaoliang* (N en N, CA en CA, C en C y O en O) están dentro de 0,13 nm y opcionalmente 0,1 nm después de la alineación. La alineación se logra después de que el mejor modelo se ha orientado y posicionado para dar la superposición máxima de coordenadas atómicas de la glucoamilasa en cuestión a glucoamilasa I o II de *Monascus kaoliang*. El mejor modelo es el modelo cristalográfico, produciendo el menor factor R para datos de difracción experimentales en la resolución más alta disponible.

$$\text{factor R} = \frac{\sum_n |F_o(h)| - |F_c(h)|}{\sum_n |F_o(h)|}$$

Residuos equivalentes que son funcionalmente análogos a un residuo específico de glucoamilasa I o II de *Monascus kaoliang* se definen como aquellos aminoácidos de la enzima que pueden adoptar una conformación tal que o bien alteran, modifican o contribuyen a la estructura de las proteínas, unión a sustratos o catálisis en un modo definido y atribuido a un residuo específico de glucoamilasa I o II de *Monascus kaoliang*. Además, son aquellos residuos de la enzima (para la cual se puede obtener una estructura terciaria por cristalografía de rayos X) que ocupan una posición análoga al grado que, si bien los átomos de la cadena principal del residuo dado pueden no satisfacer los criterios de equivalencia en base a ocupar una posición homóloga, las coordenadas atómicas de por lo menos dos de los átomos de la cadena lateral del residuo yacen con 0,13 nm de los átomos de la cadena lateral correspondiente de glucoamilasa I o II de *Monascus kaoliang*. En algunas realizaciones, las glucoamilasas variantes contempladas en este documento pueden tener por lo menos 80% de identidad de secuencia, por lo menos 85% de identidad de secuencia, por lo menos 88% de identidad de secuencia, por lo menos 90% de identidad de secuencia, por lo menos 93% de identidad de secuencia, por lo menos 95% de identidad de secuencia, por lo menos 96% de identidad de secuencia, por lo menos 97% de identidad de secuencia, por lo menos 98% de identidad de secuencia y también por lo menos 99% de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos de glucomailasa de *Monascus kaoliang* de la SEC ID NÚM: 3 o 6.

En algunas realizaciones, una variante de glucoamilasa tendrá más de una sustitución de aminoácidos. Por ejemplo, la variante podrá tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 25 sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos, en comparación con glucoamilasa I o II de *Monascus kaoliang*. En algunas realizaciones, una variante de glucoamilasa comprende una sustitución, eliminación o inserción en por lo menos una posición del aminoácido en una posición correspondiente a las regiones de los aminoácidos no conservados. Como se contempla en este documento, las variantes de glucoamilasa pueden tener sustituciones, eliminaciones o inserciones en cualquier posición en la secuencia de proteínas maduras.

Como se contempla en este documento, una secuencia de ADN que codifica glucoamilasa o una variante de glucoamilasa se puede expresar en forma de enzima, usando un vector de expresión que típicamente incluye secuencias control que codifican un promotor, operador, sitio de unión al ribosoma, señal de inicio de la traducción y, opcionalmente, un gen represor o diversos genes activadores. El vector de expresión recombinante que porta la secuencia de ADN que codifica una glucoamilasa contemplada en el presente documento puede ser cualquier vector que pueda convenientemente someterse a procedimientos de ADN recombinante. El vector puede ser uno que, al introducirse en *Monascus kaoliang*, se integre en el genoma y se replique junto con el cromosoma(s) al que se ha integrado. Por ejemplo, la célula fúngica se puede transformar con el constructo de ADN que codifica la glucoamilasa, e integrando el constructo de ADN en una o más copias, en el cromosoma(s) del hospedante. Esta integración en general se considera una ventaja, ya que es más probable que la secuencia de ADN se mantenga establemente. La integración de los constructos de ADN en el cromosoma hospedante puede realizarse de acuerdo con métodos convencionales, tal como por recombinación homóloga o heteróloga.

En una realización que incorpora el uso de un vector, la secuencia de ADN debe estar operativamente conectada a una secuencia promotora adecuada. La promotora puede ser cualquier secuencia de ADN que demuestre actividad

de transcripción en *Monascus kaoliang* y puede derivar de genes que codifican proteínas o bien homólogas o heterólogas a *Monascus kaoliang*. Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de ADN que codifica una variante de glucoamilasa son, como ejemplo no limitativo solamente, aquellos derivados del gen que codifica *A. oryzae* TAKA amilasa, celobiohidrolasa I *T. reesei*, proteinasa aspártica *Rhizomucor miehei*,  $\alpha$ -amilasa neutra *A. niger*,  $\alpha$ -amilasa estable ácida *A. niger*, glucoamilasa *A. niger*, lipasa *Rhizomucor miehei*, alcalina proteasa *A. oryzae* o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa *A. nidulans* *A.* Cualquier vector de expresión contemplado puede también comprender un terminador de transcripción adecuado y secuencias de poliadenilación operablemente conectadas a la secuencia de ADN que codifica la glucoamilasa o variante. Las secuencias de terminación y poliadenilación pueden adecuadamente derivar de las mismas fuentes que el promotor. El vector puede además comprender cualquier secuencia de ADN que permita o genere que el vector se replique en el hospedante fúngico. El vector puede también comprender genes adicionales, cuyo producto puede complementar un defecto en el hospedante fúngico. Por ejemplo, los marcadores seleccionables se pueden incorporar para proveer resistencia a los fármacos. Como se contempla en este documento, todos los procedimientos utilizados para ligar constructos de ADN que codifican una glucoamilasa, el promotor, el terminador y otros elementos, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, son aquellos entendidos por el experto en la técnica.

En un aspecto, la invención se refiere a una célula hospedante que tiene expresión heteróloga de un polipéptido descrito en este documento, tal como una célula fúngica, por ejemplo del género *Trichodema* tal como *Trichodema reesei*. En otro aspecto, la célula fúngica es de la especie *Hypocrea jecorina*.

En un aspecto, la célula hospedante comprende, o preferiblemente se transforma con, un plásmido o vector de expresión y por lo tanto es capaz de expresar un polipéptido contemplado en la presente invención. En un aspecto, el vector de expresión comprende un ácido nudeico y el vector de expresión o plásmido contemplado en la presente invención puede comprender un promotor derivado de *Trichodema* tal como un promotor derivado de *T. reesei* cbhl y/o el terminador derivado de *Trichodema* tal como un terminador derivado de *T. reesei* cbhl y/o uno o más marcadores selectivos tales como *Aspergillus nidulans* amdS y pyrG y/o una o más regiones de telómeros que permiten el mantenimiento de un plásmido no cromosómico en una célula hospedante.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para aislar un polipéptido descrito en este documento, en donde el método comprende las etapas de inducir la síntesis del polipéptido en una célula hospedante que tiene expresión heteróloga de dicho polipéptido, recuperando la proteína extracelular segregada por dicha célula hospedante, y opcionalmente purificando el polipéptido. En otra realización, las glucoamilasas se pueden producir a partir de *Monascus kaoliang* modificada. Por ejemplo, *Monascus kaoliang* se puede modificar genéticamente como para producir glucoamilasas enriquecidas o sobre-expresadas. Los métodos de extracción pueden incluir aquellos descritos en los ejemplos experimentales expuestos a continuación, o cualquier método de extracción de glucoamilasas de un cultivo, como entendería el experto en la técnica. En una realización, la glucoamilasa puede producirse excesivamente de una cepa de *Monascus kaoliang* genéticamente modificada que tiene múltiples copias del gen de glucoamilasa. En otra realización, la cepa fúngica puede estar genéticamente modificada para inactivar otras enzimas segregadas. En otra realización, una o más copias de los genes de glucoamilasa pueden estar operativamente unidas a un promotor diferente, tal como una región promotora altamente eficiente de otro gen. Incluso en otra realización, la cepa fúngica puede ser deficiente de proteasa o una cepa proteasa *minus*.

Otro aspecto se refiere a un proceso mejorado y rentable para aislar glucoamilasa I y II adecuadas para procedimientos de purificación de proteínas a gran escala. En una realización, el método incluye las etapas de desarrollar un cultivo de *Monascus kaoliang* e inducir la síntesis de una glucoamilasa. La secuencia de ADN que codifica glucoamilasa puede ser la secuencia natural o no modificada, o puede ser una secuencia modificada. *Monascus kaoliang* se puede transformar por procedimientos que implican la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos seguida por regeneración de la pared celular, de acuerdo con métodos y procedimientos estándar conocidos por el experto en la técnica. Se puede emplear cualquier método estándar para transformar *Monascus kaoliang*. El medio utilizado para cultivar *Monascus kaoliang* puede ser cualquier medio convencional adecuado para desarrollar el hospedante fúngico e inducir la expresión de la glucoamilasa o su variante. Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar de acuerdo con fórmulas publicadas. La glucoamilasa o sus variantes segregadas de *Monascus kaoliang* se pueden recuperar convenientemente del medio de cultivo por procedimientos convencionales, lo que incluye separar las células del medio por centrifugación o filtración, y precipitar componentes proteínicos del medio a través de una sal tal como sulfato de amonio, seguida del uso de procedimientos cromatográficos tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o similar. Ya que la glucoamilasa es la única enzima dominante segregada por *Monascus kaoliang*, cualquier etapa de separación adicional para eliminar enzimas indeseadas, tales como alfa amilasas, o bien se minimiza o es innecesaria. Al eliminar la necesidad de aislar la glucoamilasa de otros componentes proteínicos indeseados, se crea un procedimiento de eficiencia significativa y rentable. Además, el hospedante de *Monascus kaoliang* provee por lo menos un rendimiento similar de glucoamilasa que las otras células hospedantes de glucoamilasa, y en otra realización, el uso de *Monascus kaoliang* como hospedante proporciona un mayor rendimiento de glucoamilasa o su variante, en comparación con las células hospedantes de glucoamilasa históricas.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para aislar un polipéptido descrito en este documento, en donde el método comprende las etapas de inducir la síntesis del polipéptido en una célula hospedante que tiene expresión heteróloga de dicho polipéptido, recuperando la proteína extracelular segregada por dicha célula hospedante, y opcionalmente purificando el polipéptido.

- 5 La actividad y/o actividad específica de cualquier glucoamilasa contemplada en la presente invención se determina con métodos estándar que comprendería el experto en la técnica.

#### 4. Composiciones y usos

10 La glucoamilasa contemplada en la presente invención se puede utilizar en composiciones que incluyen, aunque sin limitarse a ello, composiciones que hidrolizan y sacarifican almidón, composiciones de limpieza y detergentes (p. ej., detergentes de lavandería, detergentes lavavajillas y composiciones de limpieza de superficies duras), composiciones de fermentación de alcohol y composiciones de pienso para animales, por ejemplo. Además, estas glucoamilasas se pueden utilizar en aplicaciones de panificación, tales como producción de pan y pasteles, cervecería, asistencia sanitaria, textil, procedimientos de conversión de desechos ambientales, procesamiento de biopulpa y aplicaciones de conversión de biomasa.

15 En algunas realizaciones, una composición que comprende una glucoamilasa contemplada en la presente invención opcionalmente se empleará en combinación con una cualquiera o una combinación de las siguientes enzimas – alfa amilasas, beta-amilasas, peptidasas (proteasas, proteinasas, endopeptidasas, exopeptidasas), pululanasa, isoamilasas, celulasas, hemicelulasas, endo-glucanasas y enzimas accesorias hidrolíticas de beta-glucano relacionadas, xilanasas y enzimas accesorias de xilanasas, acetolactato descarboxilasas, ciclodextrina  
20 glucotransferasas, lipasas, fitasas, laccasas, oxidasas, estererasas, cutinasas, enzimas que hidrolizan almidón granular y otras glucoamilasas.

25 En algunas realizaciones, la composición incluirá una o más de otras enzimas. En algunas realizaciones, la composición incluirá una o más de otras enzimas seleccionadas entre alfa-amilasa, beta-amilasa, peptidasa (tal como proteasa, proteinasa, endopeptidasa, exopeptidasa), pululanasa, isoamilasa, celulasa, endo-glucanasa y enzimas accesorias hidrolíticas de beta-glucano relacionadas, xilanasas y enzimas accesorias de xilanasas (por ejemplo, arabinofuranosidasa, esterasa de ácido ferúlico, xilan acetil esterasa), acetolactato descarboxilasa y glucoamilasa, incluidas cualquiera de sus combinaciones.

30 En otra realización, el polipéptido(s) contemplado en este documento y/o una o más de otras enzimas se inactiva por pasteurización, tal como usando menos de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 24, 23, 22, 21 o 20 unidades de pasteurización (PU) en cerveza, tal como cerveza Pilsner.

35 En algunas realizaciones, la composición incluirá una alfa amilasa tal como alfa amilasas fúngicas (p. ej., *Aspergillus sp.*) o alfa amilasas bacterianas (p. ej., *Bacillus sp.* tal como *B. stearothermophilus*, (*Geobacillus stearothermophilus*), *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis*) y sus variantes e híbridos. En algunas realizaciones, la alfa amilasa es una alfa amilasa estable ácida. En algunas realizaciones, la alfa amilasa es alfa amilasa *Aspergillus kawachi* (AkAA), véase la patente de EE.UU. núm. 7.037.704. Las alfa amilasas comercialmente disponibles contempladas para uso en las composiciones de la descripción se conocen e incluyen GZYME® G-997, SPEZYME® FRED, SPEZYME® XTRA (Danisco US, Inc, Genencor Division), TERMAMYL 120-I y SUPRA (Novozymes, Biotech.).

40 En algunas realizaciones, la composición incluirá una proteasa fúngica ácida. En otra realización, la composición incluirá la endo-proteasa (EC 3.4.21.26) proveniente de una variante del microorganismo *Aspergillus niger* que hidroliza péptidos en el sitio carboxilo de los residuos prolina descritos en el documento WO 2007/101888 publicado el 13 de septiembre de 2007. En otra realización, la proteasa fúngica ácida deriva de un *Trichoderma sp* y puede ser una cualquiera de las proteasas descritas en el documento US 2006/0154353, publicado el 13 de julio de 2006, incorporado a la presente memoria por referencia. En otra realización, la composición incluirá una fitasa de  
45 *Buttiauxiella spp.* (p. ej., BP-17, véanse también las variantes descritas en la publicación de patente PCT WO 2006/043178). En otra realización, la composición incluirá una acetolactato descarboxilasa (ALDC) EC 4.1.1.5, por ejemplo de *Bacillus licheniformis* o del gen ALDC de *Bacillus brevis* expresado en una cepa modificada de *Bacillus subtilis* como se describe en el documento US 4.617.273 publicado el 14 de octubre 1986.

50 En otras realizaciones, las glucoamilasas contempladas en este documento se pueden combinar con otras de dichas glucoamilasas. En algunas realizaciones, dichas glucoamilasas se combinarán con una o más glucoamilasas derivadas de diversas otras cepas o variantes de *Monascus kaoliang*, o de *Aspergillus* o sus variantes, tales como *A. oryzae*, *A. niger*, *A. kawachi* y *A. awamori*; glucoamilasas derivadas de cepas de *Humicola* o sus variantes; glucoamilasas derivadas de cepas de *Talaromyces* o sus variantes, tales como *T. emersonii*; glucoamilasas derivadas de cepas de *Athelia*, tales como *A. rolfsii*; o glucoamilasas derivadas de cepas de *Penicillium*, tales como  
55 *P. chrysogenum*, por ejemplo.

En particular, las glucoamilasas contempladas en este documento se pueden usar para procesos de conversión de almidón, y particularmente en la producción de dextrosa para jarabe de fructosa, especialmente azúcares en la producción de alcohol y otros productos finales (p. ej., ácido orgánico, ácido ascórbico y aminoácidos) a partir de la

fermentación de sustratos que contienen almidón (G.M.A. van Beynum et al., Eds. (1985) STARCH CONVERSION TECHNOLOGY, Marcel Dekker Inc. NY). Las dextrinas producidas usando las composiciones de glucoamilasa variantes de la descripción pueden resultar en rendimientos de glucosa de por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90% y por lo menos 95%. La producción de alcohol a partir de la fermentación de sustratos de almidón usando glucoamilasas como se contempla en este documento puede incluir la producción de alcohol combustible o alcohol potable. En algunas realizaciones, la producción de alcohol será mayor cuando se usan glucoamilasas variantes bajo las mismas condiciones que la glucoamilasa de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la producción de alcohol será entre aproximadamente 0,5% y 2,5% mejor, incluido, aunque sin limitarse a ello, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 1,1%, 1,2%, 1,3%, 1,4%, 1,5%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, 2,0%, 2,1%, 2,2%, 2,3% y 2,4% más alcohol que la glucoamilasa de tipo silvestre.

En algunas realizaciones, las glucoamilasas contempladas en este documento se usarán en la hidrólisis de almidón de distintos sustratos basados en plantas, usualmente material vegetal que contiene almidón y/o azúcar, que se usan para la producción de alcohol. En algunas realizaciones, los sustratos basados en plantas incluirán maíz, trigo, cebada, centeno, milo, arroz, caña de azúcar, patata, mandioca y sus combinaciones. En algunas realizaciones, el sustrato basado en plantas será material vegetal fraccionado, por ejemplo un grano de cereal tal como maíz, que se fracciona en componentes tales como fibra, germen, proteína y almidón (endoesperma) (patente de EE.UU. núm. 6.254.914 y patente de EE.UU. núm. 6.899.910). Los métodos de fermentación de alcohol se describen en THE ALCOHOL TEXTBOOK, A REFERENCE FOR THE BEVERAGE, FUEL AND INDUSTRIAL ALCOHOL INDUSTRIES, 3era Ed., Eds K.A. Jacques et al., 1999, Nottingham University Press, Reino Unido. En algunas circunstancias, el alcohol será etanol. En particular, los procesos de producción de fermentación de alcohol se caracterizan como procesos de molienda en húmedo o molienda en seco. En algunas realizaciones, la glucoamilasa se usará en un proceso de fermentación de molienda en húmedo y en otras realizaciones la glucoamilasa encontrará uso en un proceso de molienda en seco.

La molienda de granos en seco implica una serie de pasos básicos, que en general incluyen: trituración, cocción, licuefacción, sacarificación y separación de líquidos y sólidos para producir alcohol y otros co-productos. El material vegetal y particularmente los granos de cereales integrales, tales como maíz, trigo o centeno se trituran. En algunos casos, el grano puede fraccionarse primero en partes de componentes. El material vegetal triturado puede molerse hasta obtener una partícula gruesa o fina. El material vegetal triturado se puede mezclar con líquido (p. ej., agua y/o residuos de destilación) en un tanque de suspensión. La suspensión se somete a altas temperaturas (p. ej., 90°C a 105°C o más) en un inyector de vapor junto con enzimas de licuefacción (p. ej., alfa amilasas) para solubilizar e hidrolizar el almidón en el grano hasta dextrinas. La mezcla se puede enfriar y posteriormente tratarse con enzimas de sacarificación, tales como glucoamilasas abarcadas por la presente descripción, para producir glucosa. El empaste que contiene glucosa puede luego fermentarse durante aproximadamente 24 a 120 horas en presencia de microorganismos de fermentación, tales como microorganismos que producen etanol y particularmente levadura (*Saccharomyces spp*). Los sólidos en el empaste se separan de la fase líquida y se obtienen alcohol, tal como etanol, y co-productos tales como granos de destiladores.

En algunas realizaciones, la etapa de sacarificación y la etapa de fermentación se combinan y el proceso se denomina sacarificación y fermentación simultáneas, o sacarificación, propagación de levadura y fermentación simultáneas.

En otras realizaciones, estas glucoamilasas se pueden utilizar en un procedimiento para hidrólisis de almidón en donde la temperatura del procedimiento oscila entre 30°C y 75°C, en algunas realizaciones, entre 40°C y 65°C. En algunas realizaciones, la glucoamilasa se puede utilizar en un procedimiento para hidrólisis de almidón a un pH entre pH 3,0 y pH 6,5. Los procedimientos de fermentación incluyen molienda de un grano de cereal o grano fraccionado y combinar el grano de cereal triturado con líquido para formar una suspensión que puede luego mezclarse en un solo recipiente con una glucoamilasa de acuerdo con la descripción y opcionalmente otras enzimas tales como, aunque sin limitarse a ello, alfa amilasas, otras glucoamilasas, fitasas, proteasas, pululaninas, isoamilasas u otras enzimas que tengan actividad de hidrólisis de almidón granular y levadura para producir etanol y otros co-productos (véase, p. ej., la patente de EE.UU. núm. 4.514.496, y los documentos WO 04/081193 y WO 04/080923).

En algunas realizaciones, la descripción pertenece al método de sacarificar una disolución líquida de almidón, que comprende una etapa de sacarificación enzimática que emplea una o más glucoamilasas descritas en la presente invención.

En algunas realizaciones, la descripción pertenece a un método para hidrolizar y sacarificar almidón gelatinizado y licuado (típicamente) molido que se ha de utilizar en la elaboración de cerveza, mediante lo cual una composición que comprende una o más glucoamilasas contempladas en la presente invención, se usa para mejorar la cantidad de azúcares fermentables de levadura de cerveza que se obtiene del almidón. Un procedimiento de elaboración de cerveza se utiliza para producir el producto potable, cerveza, en donde los azúcares fermentables se convierten a etanol y CO<sub>2</sub> por fermentación con levadura de cerveza. Los azúcares fermentables tradicionalmente derivan del almidón de los granos de cereal, opcionalmente complementados con fuentes de azúcar fermentable tales como jarabes de glucosa y maltosa, y caña de azúcar. En síntesis, la producción de cerveza, conocida en la técnica, típicamente incluye las etapas de malteo, empaste y fermentación.

Históricamente, la primera etapa en la producción de cerveza es el malteo –maceración, germinación y secado del grano de cereal (p. ej., cebada). Durante el malteo, las enzimas se producen en la semilla de cereal germinante (p. ej., cebada) y hay ciertos cambios en sus constituyentes químicos (conocidos como modificación) incluida cierta degradación de almidón, proteínas y beta -glucanos.

5 El cereal malteado se muele para dar una molienda que puede mezclarse con un auxiliar molido (p. ej., grano de cereal no germinado) para dar una molienda mixta. La molienda puede además consistir predominantemente, o exclusivamente, en auxiliar. La molienda se mezcla con agua y se somete a empastado; un auxiliar previamente cocido (gelatinizado y licuado) (el resultado de la "cocción del auxiliar") puede añadirse al empaste. El proceso de empastado se realiza en un periodo de tiempo a diversas temperaturas con el fin de hidrolizar las proteínas del cereal, degradar los beta-glucanos y solubilizar e hidrolizar el almidón. Se cree que la hidrólisis del almidón molido en la malta y el auxiliar en el empastado tradicional es catalizada por dos enzimas principales endógenas a la cebada malteada. La alfa-amilasa escinde enlaces alfa-1,4 en el interior de la molécula de almidón, fragmentándolos en dextrinas más pequeñas. La beta-amilasa escinde secuencialmente enlaces alfa-1,4 del extremo no reductor de estas dextrinas, produciendo principalmente maltosa. Tanto la alfa como la beta amilasa son incapaces de hidrolizar los enlaces alfa-1,6 que forman los puntos de ramificación de las cadenas de almidón en la molécula de almidón, lo que resulta en la acumulación de las dextrinas límite en el empaste. La malta contiene una enzima, dextrinasa límite, que cataliza la hidrólisis de enlaces alfa-1,6 pero muestra solamente actividad débil a temperaturas de empastado debido a su termolabilidad. Después de empastar, el extracto de líquido (mosto) se separa de los sólidos de cebadillas (es decir, el grano insoluble y el material de cáscara que forman parte de una molienda). Los objetivos de separación del mosto incluyen: • obtener buena recuperación del extracto, • obtener buena capacidad de filtración, y • producir un mosto claro. La recuperación del extracto y la capacidad de filtración del mosto son importantes en la economía del proceso de fabricación de la cerveza.

La composición del mosto depende de la materia prima, el proceso de empastado y los perfiles y otras variables. Un mosto típico comprende 65-80% azúcares fermentables (glucosa, maltosa y maltotriosa, y 20-35% dextrinas límite no fermentables (azúcares con un grado mayor de polimerización que la maltotriosa). Una insuficiencia de enzimas hidrolíticas de almidón durante el empastado puede surgir cuando se elabora cerveza con altos niveles de moliendas de cereales no malteados auxiliares. Por lo tanto, se necesita una fuente de enzimas exógenas, capaces de producir azúcares fermentables durante el proceso de empastado. Asimismo, dichas enzimas exógenas también son necesarias para reducir el nivel de azúcares no fermentables en el mosto, con un incremento correspondiente en los azúcares fermentables, con el fin de elaborar cervezas altamente atenuadas con un bajo contenido de carbohidratos. Se describe en este documento una composición enzimática para hidrólisis de almidón que comprende por lo menos una glucoamilasa contemplada en la presente invención, que puede añadirse al empaste o emplearse en la etapa de empastado de un proceso de elaboración de cerveza, con el fin de escindir enlaces alfa-1,4 y/o alfa-1,6 en moliendas de almidón y aumentar así el contenido de azúcar fermentable del mosto y reducir el residuo de azúcares no fermentables en la cerveza terminada. Además, el mosto así producido puede secarse (por ejemplo por atomización) o concentrarse (p. ej., ebullición y evaporación) para proveer un jarabe o un polvo.

La molienda contemplada en la presente invención puede comprender cualquier material vegetal que contenga almidón y/o azúcar derivable de cualquier planta o parte de planta, incluidos, p. ej., tubérculos, raíces, tallos, hojas y semillas previamente descritos. Preferiblemente, la molienda comprende grano, tal como el grano de cebada, trigo, centeno, avena, maíz, arroz, milo, mijo y sorgo, y más preferiblemente, por lo menos 10%, o más preferiblemente por lo menos 15%, incluso más preferiblemente por lo menos 25% o lo más preferiblemente por lo menos 35%, tal como por lo menos 50%, por lo menos 75%, por lo menos 90% o incluso 100% (p/p) de la molienda del mosto deriva del grano. Lo más preferiblemente, la molienda comprende grano malteado, tal como malta de cebada. Preferiblemente, por lo menos 10%, o más preferiblemente por lo menos 15%, incluso más preferiblemente por lo menos 25% o lo más preferiblemente por lo menos 35%, tal como por lo menos 50%, por lo menos 75%, por lo menos 90% o incluso 100% (p/p) de la molienda del mosto deriva de grano malteado. Preferiblemente, la molienda comprende auxiliar, tal como grano no malteado de cebada, trigo, centeno, maíz, arroz, milo, mijo y sorgo, y más preferiblemente por lo menos 10%, o más preferiblemente por lo menos 15%, incluso más preferiblemente por lo menos 25%, o lo más preferiblemente por lo menos 35%, tal como por lo menos 50%, por lo menos 75%, por lo menos 90% o incluso 100% (p/p) de la molienda del mosto deriva de grano no malteado u otro auxiliar. El auxiliar que comprende carbohidratos fácilmente fermentables tales como azúcares o jarabes se puede añadir al empaste de malta antes, durante o después del procedimiento de empastado de la invención pero preferiblemente se añade después del procedimiento de empastado. Una parte del auxiliar se puede tratar con alfa-amilasa y/o endopeptidasa (proteasa) y/o una endoglucanasa, y/o puede tratarse con calor antes de añadirse al empaste. La composición enzimática para hidrólisis de almidón, contemplada en la presente invención, puede incluir enzima(s) adicional, preferiblemente una enzima seleccionada entre una alfa-amilasa, beta-amilasa, peptidasa (proteasa, proteinasa, endopeptidasa, exopeptidasa), pululanasa, isoamilasa, celulasa, endo-glucanasa y enzimas accesorias de beta-glucano relacionadas, xilanasas y enzimas accesorias de xilanasas (por ejemplo, arabinofuranosidas, esterasa de ácido ferúlico, xilano acetil esterasa), acetolactato descarboxilasa y glucoamilasa, incluidas cualquiera de sus combinaciones. Durante el procedimiento de empastado, el almidón extraído de la molienda se hidroliza gradualmente en azúcares fermentables y dextrinas más pequeñas. Preferiblemente, el empaste es almidón negativo a pruebas de yodo, antes de la separación del mosto.

Después del empastado, el mosto (mosto de extracto líquido) se separa de los sólidos de las cebadillas mediante el proceso de lautering (separación de los cereales del mosto) o filtración del empaste. Los objetivos de separación del mosto incluyen: buena recuperación del extracto, buena capacidad de filtración y un mosto claro (se puede hallar más información en "Technology Brewing and Malting" de Wolfgang Kunze del Research and Teaching Institute of Brewing, Berlín (VLB), 3era edición completamente actualizada, 2004, ISBN 3-921690-49-8).

Antes de la tercera etapa del procedimiento de elaboración de cerveza, la fermentación, el mosto típicamente es transferido a una caldera y sometido a ebullición vigorosamente durante 50 - 60 minutos. Una serie de importantes procesos ocurren durante la ebullición del mosto (se puede hallar más información en "Technology Brewing and Malting" de Wolfgang Kunze del Research and Teaching Institute of Brewing, Berlín (VLB), 3era edición completamente actualizada, 2004, ISBN 3-921690-49-8) incluida la inactivación de las enzimas de malta endógenas y cualquier enzima exógena añadida al empaste o auxiliar. El mosto sometido a ebullición luego se enfría, se mezcla con la levadura de cerveza y se fermenta a temperaturas que oscilan entre 8-16 °C para convertir los azúcares fermentables en etanol. Una cerveza con bajo contenido de alcohol se puede producir a partir de la cerveza final, mediante un procedimiento de evaporación al vacío que sirve para eliminar selectivamente el alcohol. Asimismo, se pueden añadir lúpulos al mosto.

En un aspecto, la invención se refiere al uso de un polipéptido o una composición contemplada en la presente invención en una fermentación, en donde dicho polipéptido o composición se añade antes o durante una etapa de fermentación. En otro aspecto, a dicha etapa de fermentación le sigue una etapa de pasteurización. En un aspecto, dicha bebida fermentada se selecciona del grupo que consiste en cerveza tal como cerveza con bajo contenido de alcohol o cerveza de bajas calorías. En otro aspecto, dicho polipéptido o dicha composición se añade en combinación con una o más enzimas, tales como aquellas seleccionadas entre alfa-amilasa, proteasa, pululanasa, isoamilasa, celulasa, endoglucanasa, xilanasas, arabinofuranosidasa, esterasa de ácido ferúlico, xilano acetil esterasa y glucoamilasa, incluidas cualquiera de sus combinaciones. Incluso en otro aspecto, el polipéptido y/o la otra u otras enzimas se inactivan en la etapa de pasteurización.

En un aspecto, el polipéptido(s) contemplado en la presente invención se añade en una cantidad de por ejemplo 1-1000 mg pr. kg molienda, tal como 20-500 mg pr. kg molienda, tal como 30-400 mg pr. kg molienda tal como 40-300 mg pr. kg molienda, tal como 50-200 mg pr. kg molienda.

En un aspecto, el polipéptido(s) contemplado en la presente invención se añade en una cantidad de por ejemplo, por lo menos 1, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 mg pr. kg. molienda.

En una realización alternativa, la invención se refiere a un método tal como un método en el que una fermentación está comprendida en un proceso para elaborar una bebida fermentada, en donde el método comprende añadir un polipéptido o una composición descrita en este documento antes o durante una etapa de fermentación, tal como en un método que comprende una etapa de fermentación o una etapa de filtración de cerveza opcional.

En un aspecto, la invención se refiere a un método para producción de una bebida fermentada que comprende las siguientes etapas:

a) preparar un empaste, tal como aquel obtenido de una molienda, en donde dicha molienda, por ejemplo, comprende uno o más granos malteados y/o no malteados, o material basado en almidón de otro cultivo, y donde esta etapa opcionalmente comprende también poner en contacto dicho empaste con una o más de otras enzimas,

b) filtrar el empaste para obtener un mosto, y

c) fermentar el mosto para obtener una bebida fermentada,

y opcionalmente una etapa de pasteurización (d)

en donde un polipéptido o una composición descrita en este documento se añade a:

i. el empaste de la etapa (a) y/o

ii. el mosto de la etapa (b) y/o

iii. el mosto de la etapa (c).

En un aspecto, la enzima o enzimas que se añaden opcionalmente en la etapa a se pueden seleccionar entre una enzima de des-ramificación de almidón, enzima R, dextrinasa límite, alfa-amilasa, beta-amilasa, peptidasa (proteasa, proteinasa, endopeptidasa, exopeptidasa), pululanasa, isoamilasa, celulasa, endo-glucanasa y enzimas accesorias hidrolíticas beta-glucano relacionadas, xilanasas y enzimas accesorias de xilanasas (por ejemplo, arabinofuranosidasa, esterasa de ácido ferúlico, xilano acetil esterasa), acetolactato des carboxilasa y glucoamilasa, incluidas cualquiera de sus combinaciones. En otro aspecto, una o más enzimas pueden también añadirse contactando el mosto de la etapa (b) o (c) con una o más de otras enzimas, en donde la enzima se selecciona entre una enzima de des-ramificación de almidón, isoamilasa y dextrinasa límite, incluidas cualquiera de sus combinaciones.

En una realización alternativa, la descripción pertenece a un método para mejorar la cantidad de azúcares fermentables en el mosto, usando una composición que comprende una o más glucoamilasas contempladas en este documento (p. ej., glucoamilasa termolábil), mediante lo cual la composición se añade al mosto después de que se ha sometido a ebullición, de modo tal que una o más glucoamilasas están activas durante la etapa de fermentación.

5 La composición puede añadirse al mosto sometido a ebullición o bien antes, simultáneamente o después de que el mosto se siembra con la levadura de cerveza. Al final de la etapa de fermentación y maduración, la cerveza, que puede opcionalmente someterse a evaporación al vacío para producir una cerveza con bajo contenido de alcohol, se filtra luego opcionalmente y/o se pasteuriza. Una ventaja inherente de este método yace en la duración del proceso de fermentación, que dura aproximadamente 6-15 días (dependiendo de la velocidad de siembra, la fermentación, la temperatura, etc), que permite más tiempo para la escisión enzimática de azúcares no fermentables, en comparación con la corta etapa de empastado (2-4 h de duración). Otra ventaja de este método consiste en la cantidad de la composición necesaria para lograr la reducción deseada en azúcares no fermentables (y el incremento en azúcares fermentables), que corresponde a un número significativamente inferior de unidades de actividad enzimática (p. ej., unidades de actividad de glucoamilasa) que lo que sería necesario añadir al empaste para lograr una reducción similar en azúcares no fermentables. A su vez, elimina las dificultades que a menudo se observan durante la separación del mosto, especialmente por *lautering*, cuando se añaden altas proporciones de glucoamilasa en el empaste. En contraste con las fuentes alternativas de enzima glucoamilasa, se ha descubierto sorprendentemente que las glucoamilasas contempladas en la presente invención son suficientemente sensibles a temperatura, que la etapa de tratamiento con calor final de la cerveza terminada (condiciones de pasteurización estándar) es suficiente para que su actividad catalítica sea inactivada. En consecuencia, una ventaja importante de la composición que comprende una o más glucoamilasas contempladas en este documento, es que se puede utilizar para reducir la cantidad de azúcares no fermentables en el mosto durante la etapa de fermentación de la elaboración de cerveza con el fin de elaborar cervezas altamente atenuadas con un bajo contenido de carbohidratos, y en donde la actividad catalítica de la composición es susceptible a la inactivación por el tratamiento con calor durante la pasteurización de la cerveza, evitando así el gasto de reactores enzimáticos inmovilizados o el uso de levadura de cerveza genéticamente modificada.

La presente descripción también da a conocer un método para la producción de un alimento, pienso o producto de bebida, tal como una bebida alcohólica o no alcohólica, tal como una bebida a base de cereal o malta como cerveza o whisky, tal como vino, cidra, vinagre, vino de arroz, salsa de soya o jugo, en donde dicho método comprende la etapa de tratar un material vegetal que contiene almidón y/o azúcar con un polipéptido o una composición descrita en la presente invención. En otro aspecto, la invención también se refiere a un kit que comprende un polipéptido, o una composición contemplada en esta invención; e instrucciones para uso de dicho polipéptido o composición. La invención también se refiere a una bebida fermentada producida por un método descrito en este documento.

La presente descripción también da a conocer una composición o formulación para pienso animal que comprende por lo menos una glucoamilasa contemplada en la presente invención. Los métodos de uso de una enzima glucoamilasa en la producción de piensos que comprenden almidón se dan a conocer, por ejemplo, en el documento WO 03/049550 (incorporado a la presente memoria por referencia en su totalidad). En síntesis, la glucoamilasa se mezcla con un pienso que comprende almidón. La glucoamilasa es capaz de degradar almidón resistente para ser usado por el animal.

Otros objetos y ventajas de la presente descripción serán obvios a partir de la presente memoria.

5. Otras realizaciones de acuerdo con la invención:

Realización 1. Un polipéptido aislado que tiene actividad de glucoamilasa seleccionada del grupo que consiste en:

a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en el polipéptido maduro de las SEC ID NÚM: 3 y 6;

b) un polipéptido codificado por i) la secuencia de ácido nucleico comprendida en la SEC ID NÚM:1 o en la SEC ID NÚM:4, o ii) la secuencia de ADNc de i), o iii) la secuencia de la SEC ID NÚM:2 o SEC ID NÚM:5; o iv) por un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones de baja rigurosidad con la cadena complementaria de i), ii) o iii);

c) un polipéptido que comprende una sustitución, eliminación y/o inserción conservadora de uno o más aminoácidos de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el polipéptido maduro de las SEC ID NÚM: 3 y 6;

d) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la secuencia codificante de polipéptidos maduros de la SEC ID NÚM: 3 o 6; y

e) un fragmento de un polipéptido de a), b), c) o d) que tiene actividad de glucoamilasa.

Realización 2. Un polipéptido aislado que tiene actividad de glucoamilasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de

identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el polipéptido maduro de las SEC ID NÚM: 3 y 6.

5 Realización 3. Un polipéptido aislado que tiene actividad de glucoamilasa codificado por i) la secuencia de ácido nucleico comprendida en la SEC ID NÚM:1 o en la SEC ID NÚM:4, o ii) la secuencia de ADNc de i), o iii) la secuencia de la SEC ID NÚM:2 o la SEC ID NÚM:5; o iv) por un polinucleótido que se hibrida por lo menos bajo condiciones de baja rigurosidad con la cadena de complementariedad de i), ii) o iii).

Realización 4. Un polipéptido aislado que tiene actividad de glucoamilasa que comprende una sustitución, eliminación y/o inserción conservadora de uno o más aminoácidos de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el polipéptido maduro de las SEC ID NÚM: 3 y 6.

10 Realización 5. Un polipéptido aislado que tiene actividad de glucoamilasa codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la secuencia del polipéptido maduro de la SEC ID NÚM: 3 o 6.

Realización 6. Un polipéptido aislado que tiene actividad de glucoamilasa en donde el polipéptido es un fragmento de un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-5.

15 Realización 7. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-6, en donde la secuencia de aminoácidos comprende por lo menos uno o más residuos de aminoácidos seleccionados de los siguientes grupos:

a. un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en A y P en una posición correspondiente a la posición 459 en la SEC ID NÚM: 3 o 6,

20 b. un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en C y S en una posición correspondiente a la posición 473 en la SEC ID NÚM: 3 o 6,

c. un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en A y R en una posición correspondiente a la posición 474 en la SEC ID NÚM: 3 o 6,

d. un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en A y P en una posición correspondiente a la posición 475 en la SEC ID NÚM: 3 o 6,

25 e. un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en T y Y en una posición correspondiente a la posición 476 en la SEC ID NÚM: 3 o 6,

f. un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en P y G en una posición correspondiente a la posición 477 en la SEC ID NÚM: 3 o 6,

30 g. un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en A y G en una posición correspondiente a la posición 479 en la SEC ID NÚM: 3 o 6 y/o

h. un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en V y R en una posición correspondiente a la posición 480 en la SEC ID NÚM: 3 o 6.

35 Realización 8. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-7, en donde la secuencia de aminoácidos tiene por lo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NÚM: 3 o 6.

Realización 9. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-8, que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NÚM: 3 o 6, o su fragmento que tiene actividad de glucoamilasa.

Realización 10. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEC ID NÚM: 3 o 6.

40 Realización 11. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-10, en donde el porcentaje de identidad de una secuencia de aminoácidos con, o hacia, otra secuencia de aminoácidos, se determina con el uso de la búsqueda Blast proteína-proteína (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) con configuraciones predeterminadas: matriz de puntuación: blosum62, base de datos de secuencias de proteínas no redundantes y el algoritmo blast

Configuraciones	Umbral esperado	10
	Compatibilidades máx en un intervalo de averiguación	0
	Penalidad de apertura del hueco	11
	Penalidad de extensión del hueco	1
	Ajuste de composición:	

## ES 2 616 917 T3

### Ajuste de matriz de puntuación de la composición

#### Máscara y filtros

No

- Realización 12. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1- 11, en donde el polipéptido se inactiva por pasteurización tal como usando menos de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 24, 23, 22, 21 o 20 unidades de pasteurización (PU) en cerveza.
- 5 Realización 13. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1- 12, en donde el polipéptido tiene una actividad de glucoamilasa (GAU) de 0,05-10 GAU/mg, tal como 0,1-5 GAU/mg, tal como 0,5-4 GAU/mg, tal como 0,7-3 GAU/mg o tal como 1-3 GAU/mg.
- Realización 14. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-13, en donde el polipéptido no tiene un SBD.
- 10 Realización 15. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-14 que tiene como máximo 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 495, 500, 505, 507, 515, 525, 535, 545, 555, 565 o 573 residuos de aminoácidos.
- Realización 16. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-15, en donde el polipéptido está truncado en comparación con la SEC ID NÚM:3.
- 15 Realización 17. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-16, que se obtiene por expresión recombinante en una célula hospedante.
- Realización 18. Un ácido nucleico capaz de codificar un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-17.
- Realización 19. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la realización 18, o capaz de expresar un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-17.
- 20 Realización 20. El vector de expresión o plásmido definido en la realización 19, que comprende un promotor derivado de *Trichoderma* tal como un promotor derivado de *T. reesei* cbhl.
- Realización 21. El vector de expresión o plásmido definido en la realización 19, que comprende un terminador derivado de *Trichoderma* tal como un terminador derivado de *T. reesei* cbhl.
- 25 Realización 22. El vector de expresión o plásmido de acuerdo con la realización 19 que comprende uno o más marcadores selectivos tales como *Aspergillus nidulans* amdS y pyrG.
- Realización 23. El vector de expresión o plásmido de acuerdo con la realización 19 que comprende una o más regiones de telómero que permiten el mantenimiento de un plásmido no cromosómico en una célula hospedante.
- Realización 24. Una célula hospedante que tiene expresión heteróloga de un polipéptido según se define en una cualquiera de las realizaciones 1-17.
- 30 Realización 25. La célula hospedante según se define en una cualquiera de las realizaciones 17 y 24, en donde la célula hospedante es una célula fúngica.
- Realización 26. La célula hospedante de acuerdo con la realización 25, en donde la célula fúngica es del género *Trichoderma*.
- 35 Realización 27. La célula hospedante de acuerdo con la realización 26, en donde la célula fúngica es de la especie *Trichoderma reesei*.
- Realización 28. La célula hospedante de acuerdo con la realización 26, en donde la célula fúngica es de la especie *Hypocrea jecorina*.
- Realización 29. Una célula hospedante que comprende, preferiblemente transformada con, un plásmido o un vector de expresión definido en una cualquiera de las realizaciones 19-23.
- 40 Realización 30. Un método para aislar un polipéptido definido en una cualquiera de las realizaciones 1-17, en donde el método comprende las etapas de inducir la síntesis del polipéptido en una célula hospedante definida en una cualquiera de las realizaciones 25-29 que tiene expresión heteróloga de dicho polipéptido y recuperar la proteína extracelular segregada por dicha célula hospedante, y opcionalmente purificar el polipéptido.
- 45 Realización 31. Un método para producir un polipéptido definido en una cualquiera de las realizaciones 1-17, en donde el método comprende las etapas de inducir la síntesis del polipéptido en una célula hospedante definida en

una cualquiera de las realizaciones 25-29 que tiene expresión heteróloga de dicho polipéptido, y opcionalmente purificar el polipéptido.

5 Realización 32. Un método para expresar un polipéptido definido en una cualquiera de las realizaciones 1-17, en donde el método comprende obtener una célula hospedante definida en una cualquiera de las realizaciones 25-29 y expresar el polipéptido de dicha célula hospedante, y opcionalmente purificar el polipéptido.

Realización 33. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 30-32, en donde el polipéptido definido en una cualquiera de las realizaciones 1-17 es la proteína segregada dominante.

Realización 34. Una composición que comprende uno o más polipéptidos definidos en una cualquiera de las realizaciones 1-17.

10 Realización 35. La composición de acuerdo con la realización 34, en donde la composición se selecciona entre una composición que hidroliza almidón, una composición de sacarificación, una composición detergente una composición enzimática de fermentación de alcohol y una composición de pienso animal.

Realización 36. La composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 34-35, que comprende una o más de otras enzimas.

15 Realización 37. La composición de acuerdo con la realización 36, en donde una o más de otras enzimas se seleccionan entre alfa-amilasa, beta-amilasa, peptidasa (proteasa, proteinasa, endopeptidasa, exopeptidasa), pululanasa, isoamilasa, celulasa, endo-glucanasa y enzimas accesorias hidrolíticas de beta-glucano relacionadas, xilanas y enzimas accesorias de xilanas (por ejemplo, arabinofuranosidasa, esterasa de ácido ferúlico, xilano acetil esterasa), acetolactato descarboxilasa y glucoamilasa, incluidas cualquiera de sus combinaciones.

20 Realización 38. La composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 34-37, en donde el polipéptido(s) y/o una o más de otras enzimas se inactivan por pasteurización.

Realización 39. La composición de acuerdo con la realización 38, en donde el polipéptido y/o la una o más de otras enzimas se inactiva por pasteurización, tal como usando menos de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 24, 23, 22, 21 o 20 unidades de pasteurización (PU) en cerveza.

25 Realización 40. Uso de un polipéptido definido en una cualquiera de las realizaciones 1-17 o una composición definida en una cualquiera de las realizaciones 34-39 en una fermentación, en donde dicho polipéptido o composición se añade antes o durante una etapa de fermentación.

Realización 41. El uso de acuerdo con la realización 40, en donde a dicha etapa de fermentación, y a la etapa de filtración de cerveza opcional, les sigue una etapa de pasteurización.

30 Realización 42. El uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 40-41, en donde dicha fermentación está comprendida por un procedimiento para elaborar una bebida fermentada.

Realización 43. El uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 40-42, en donde dicha bebida fermentada se selecciona del grupo que consiste en cerveza, tal como cerveza con bajo contenido de alcohol o cerveza de bajas calorías.

35 Realización 44. El uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 40-43, en donde dicho polipéptido o dicha composición se añade en combinación con una o más de otras enzimas.

40 Realización 45. El uso de acuerdo con la realización 44, en donde dicha una o más de otras enzimas se selecciona entre alfa-amilasa, beta-amilasa, peptidasa (proteasa, proteinasa, endopeptidasa, exopeptidasa), pululanasa, isoamilasa, celulasa, endo-glucanasa y enzimas accesorias hidrolíticas de beta-glucano relacionadas, xilanas y enzimas accesorias de xilanas (por ejemplo, arabinofuranosidasa, esterasa de ácido ferúlico, xilano acetil esterasa), acetolactato descarboxilasa y glucoamilasa, incluidas cualquiera de sus combinaciones.

Realización 46. El uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 40-45, en donde el polipéptido y/o la una o más enzimas adicionales se inactiva en la etapa de pasteurización.

45 Realización 47. El uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 40-46, en donde el polipéptido se añade en una cantidad de 1-1000 mg pr. kg molienda, tal como 20-500 mg pr. kg molienda, tal como 30-400 mg pr. kg molienda tal como as 40-300 mg pr. kg molienda, tal como 50-200 mg pr. kg molienda.

Realización 48. Uso de un polipéptido temolábil para mejorar la producción de azúcares fermentables en la etapa de fermentación de un proceso de elaboración de cerveza, en donde el polipéptido es como se define en una cualquiera de las realizaciones 1-17.

- Realización 49. Un método que comprende añadir un polipéptido definido en una cualquiera de las realizaciones 1-17 o una composición definida en una cualquiera de las realizaciones 34-39 antes o durante una etapa de fermentación, tal como una etapa de fermentación con levadura.
- 5 Realización 50. El método de acuerdo con la realización 49 que comprende una etapa de pasteurización después de la etapa de fermentación o una etapa de filtración de cerveza opcional.
- Realización 51. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 49-50, en donde dicha fermentación está comprendida en un procedimiento para elaborar una bebida fermentada.
- 10 Realización 52. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 49-51, en donde dicha bebida fermentada se selecciona del grupo que consiste en cerveza tal como cerveza con bajo contenido de alcohol, cerveza de bajas calorías.
- Realización 53. El método según una cualquiera de las realizaciones 49-51, en donde dicho polipéptido o dicha composición se añade en combinación con una o más de otras enzimas.
- 15 Realización 54. El método de acuerdo con la realización 53, en donde dicha de una o más de otras enzimas se selecciona entre alfa-amilasa, beta-amilasa, peptidasa (proteasa, proteinasa, endopeptidasa, exopeptidasa), pululanasa, isoamilasa, celulasa, endo-glucanasa y enzimas accesorias hidrolíticas de beta-glucano relacionadas, xilanas y enzimas accesorias de xilanas (por ejemplo, arabinofuranosidasa, esterasa de ácido ferúlico, xilano acetil esterasa), acetolactato descarboxilasa y glucoamilasa, incluidas cualquiera de sus combinaciones.
- Realización 55. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 49-54, en donde el polipéptido y/o la una o más de otras enzimas se inactiva en la etapa de pasteurización.
- 20 Realización 56. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 49-55, en donde el polipéptido se añade en una cantidad de 1-1000 mg pr. kg molienda, tal como 20-500 mg pr. kg molienda, tal como 30-400 mg pr. kg molienda tal como as 40-300 mg pr. kg molienda, tal como 50-200 mg pr. kg molienda.
- Realización 57. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 49-56 para la producción de una bebida fermentada que comprende las siguientes etapas:
- 25 a) preparar un empaste,  
 b) filtrar el empaste para obtener un mosto, y  
 c) fermentar el mosto para obtener una bebida fermentada,
- en donde un polipéptido es como se define en una cualquiera de las realizaciones 1-17 o una composición definida en una cualquiera de las realizaciones 34-39 se añade a:
- 30 i. el empaste de la etapa (a) y/o  
 ii. el mosto de la etapa (b) y/ o  
 iii. el mosto de la etapa (c).
- Realización 58. El método de acuerdo con la realización 57, en donde la bebida fermentada se somete a una etapa de pasteurización (d).
- 35 Realización 59. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 57-58, en donde el empaste en la etapa (a) se obtiene a partir de una molienda.
- Realización 60. El método de acuerdo con la realización 57, en donde la molienda comprende uno o más granos malteados y/o no malteados, o material a base de almidón de otro cultivo.
- 40 Realización 61. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 57-60, que además comprende poner en contacto el empaste de la etapa (a) con una o más de otras enzimas.
- Realización 62. El método de acuerdo con la realización 61, en donde la enzima se selecciona entre una enzima de desramificación de almidón, enzima R, dextrinasa límite, alfa-amilasa, beta-amilasa, peptidasa (proteasa, proteinasa, endopeptidasa, exopeptidasa), pululanasa, isoamilasa, celulasa, endo-glucanasa y enzimas accesorias hidrolíticas de beta-glucano relacionadas, xilanas y enzimas accesorias de xilanas (por ejemplo, arabinofuranosidasa, esterasa de ácido ferúlico, xilano acetil esterasa), acetolactato descarboxilasa y glucoamilasa, incluidas cualquiera de sus combinaciones.
- 45 Realización 63. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 57-62, que además comprende poner en contacto el mosto de la etapa (b) o (c) con una o más de otras enzimas, en donde la enzima se selecciona entre

una enzima de desramificación de almidón, isoamilasa y dextrinasa límite, incluidas cualquiera de sus combinaciones.

Realización 64. Una bebida fermentada en donde la bebida fermentada es producida por un método definido en una cualquiera de las realizaciones 49-63.

- 5 Realización 65. La bebida fermentada de acuerdo con la realización 64, que es cerveza tal como cerveza con bajo contenido de alcohol o cerveza de bajas calorías.

10 Realización 66. Un método para la producción de un alimento, pienso o producto de bebida tal como una bebida alcohólica o no alcohólica, tal como una bebida a base de cereal o malta como cerveza o whisky, tal como vino, cidra, vinagre, vino de arroz, salsa de soya o jugo, en donde el método comprende la etapa de tratar un material vegetal que contiene almidón y/o azúcar con un polipéptido de acuerdo con las realizaciones 1-17, o una composición definida en una cualquiera de las realizaciones 34-39.

Realización 67. Un kit que comprende un polipéptido de acuerdo con las realizaciones 1-17, o una composición definida en una cualquiera de las realizaciones 34-39; e instrucciones para uso de dicho polipéptido o composición.

15 Se presentan los siguientes ejemplos, y se debe interpretar que se pueden efectuar diversas modificaciones sin desviarse del espíritu de las realizaciones analizadas.

### 5. Ejemplos experimentales

#### Ejemplo 1

Análisis de actividad enzimática en un caldo de fermentación de *Monascus kaoliang* y comparación con otros microorganismos

20 Se fermentó CBS302.78 en 50 ml de medio MD [ácidos Casamino (9 g/l), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1 g/l), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 g/l), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (4,5 g/l), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (1 g/l), PIPSS (33 g/l), 2,5 ml/l elementos traza de *T. reesei* [ácido cítrico (175 g/l), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (200 g/l), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (16 g/l), Cu SO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (3,2 g/l), MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (1,4 g/l), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0,8 g/l)], 500 ml 30% maltosa, pH 5,5] durante 7 días a 28°C. Como se ilustra en la Figura 1, el caldo de fermentación de *Monascus kaoliang*, junto con otras cepas fúngicas de tipo silvestre mencionadas en la Tabla 1, se analizaron con electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico y poliacrilamida (SDS-PAGE). Todos los geles SDS\_PAGE operaron con Invitrogen NuPAGE® Novex 10% Bis-Tris Gel 1,0 mm, 12 pocillos (Cat# NP0302box), véase estándar pre-teñido Blue® (Cat# LC5625) y tampón NuPAGE® MES SDS (Cat# NP0002) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

30 Se utiliza un ensayo Bradford para la cuantificación de proteínas totales. La disolución de reactivo fue disolución de trabajo Bradford Quikstart (BioRad cat#500-0205). Se dispusieron 100 ml de sobrenadante en una placa nueva de 96 pocillos con fondo plano. A cada pocillo se le añadieron 200 UI de reactivo y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 595 nm en una lectora MTP (Molecular Devices Spectramax 384 plus). Las concentraciones de proteínas se calcularon de acuerdo con una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) (0-50 Ug/ml).

Tabla 1

Cepa	Organismo	Proteína total (mg/ml)	Unidades GAI
DMGA079	<i>Embellisia</i>	0,11	6,6
DMGA080	<i>Geomyces</i>	0,12	0,05
DMGA083	<i>Thelebolus</i>	0,09	1,4
DMGA084	<i>Emericella desertorum</i>	0,28	0,19
DMGA086	<i>Chaetomium vitellium</i>	0,43	0,3
DMGA088	<i>Monascus kaoliang</i>	0,13	6,8
DMGA089	<i>Myceliophthora thermophila</i>	0,32	0,08
DMGA091	<i>Talaromyces emersonii</i>	0,67	0,17
DMGA093	<i>Chaetomium atrobrunum</i>	0,04	0,04

35 Sorprendentemente, el caldo de fermentación de *Monascus kaoliang* demostró una intensa banda de proteína en el tamaño en el mismo intervalo que la glucoamilasa de otros hongos filamentosos (62 kDa). Se repitió la fermentación

de 50 ml de *Monascus kaoliang*, y como se ilustra en la Figura 2, el gel PAGE demostró abundantes bandas de proteínas de 62 y 49 kDa.

Las dos bandas se aislaron del gel y se analizaron por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC/MS). A partir de los resultados, se concluyó que la banda de 62 kDa representaba glucoamilasa y la banda de 49 kDa representaba la proteína precursora de glucoamilasa.

Se generó una muestra de enzima suficiente para pruebas de aplicación a pequeña escala. Se llevaron a cabo cinco fermentaciones en 400 ml de medio MD en matraces de agitación de 2 l durante 4 días a 28°C. El análisis de SDS-PAGE del caldo de fermentación se ilustra en la Figura 3. Los cultivos se centrifugaron durante 30 min a 8.500 rpm en un rotor Sorvall GS-3, y el centrifugado se esterilizó por filtración en un filtro de 0,22 mm (Millipore). El filtrado se concentró usando un dispositivo de ultra filtración VivaSpin 200 con un valor de corte de 10 kDa PM.

Ensayo de actividad de pNPG glucoamilasa:

Disoluciones de reactivo: tampón NaAc (tampón de citrato sódico 200 mM, pH 4,5); sustrato (p-nitrofenil- $\alpha$ -Dglucopiranosido 50 mM (Sigma N-1377) en tampón NaAc (0,3 g/20 ml)) y disolución de cese (tampón glicina-NaOH 800 mM, pH 10). Se dispusieron 30  $\mu$ l de sobrenadante filtrado en MTP fresco de 96 pocillos con fondo plano. A cada pocillo se le añadieron 50  $\mu$ l de tampón NaAc y 120  $\mu$ l de sustrato y se incubó durante 30 minutos a 50°C (incubador/agitador Themolab systems iEMS, HT). La reacción finalizó por adición de 100  $\mu$ l de disolución de cese. La absorbancia se midió a 405 nm en una lectora de MTP (Molecular Devices Spectramax 384 plus) y la actividad se calculó usando un coeficiente de extinción molar de 0,011  $\mu$ M/cm.

La actividad de GA se determina como se expone a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2

Cepa	Gen de:	Proteína total (mg/ml)	U GA/l	Act. Espec.
GAV213	<i>Monascus kaoliang</i>	1,66	145	87

El caldo de fermentación de *Monascus kaoliang* se comparó con aquel de *Aspergillus niger* por análisis SDS-PAGE. Como se puede observar en la Figura 4, la producción de glucoamilasa de *Monascus kaoliang* de tipo silvestre es notablemente alta, y el rendimiento de la fermentación está en el mismo orden que la cepa de *Aspergillus niger*, dgr246.

Sorprendentemente, como se ilustra en la Figura 4, el caldo de fermentación de *Aspergillus niger* contiene una alfa amilasa segregada mientras que el caldo de fermentación de *Monascus kaoliang* exhibe solamente la glucoamilasa. Por lo tanto, parece ser que la glucoamilasa es la única enzima dominante segregada por *Monascus kaoliang*.

Ejemplo 2

Esclarecimiento de los genes de glucoamilasa de *Monascus kaoliang*

Para caracterizar más la glucoamilasa de *Monascus kaoliang*, un cultivo de la cepa *Monascus kaoliang* (CBS302.78) pre-desarrollado durante una noche en medio MD con 2% maltosa, se indujo durante 8 horas en medio MD nuevo con 15% maltosa para iniciar la síntesis de glucoamilasa. Se aisló el ARN total de *M. kaoliang* usando el kit Qiagen RNeasy<sup>®</sup> plant Mini (Cat# 74904). Se usó Invitrogen RNase AWAY (Cat#10328-011) para adalar todos los materiales y las superficies de trabajo de RNase.

Se usó ARN total en la construcción de una biblioteca de ADNc usando un kit de construcción de bibliotecas Cloneminer<sup>™</sup> (Invitrogen, cat# 18249-029). Se dispusieron aproximadamente 2920 colonias de la biblioteca en medio 2TY [triptona Bacto (16 g/l), extracto de levadura Bacto (10 g/l), NaCl (5 g/l), Agar (15 g/l)] enriquecido con kanamicina (50  $\mu$ g/ml). Las colonias se transfirieron a una membrana Hybond-N (Cat# RPN2222N). Las membranas se estudiaron para inserciones de ADNc de glucoamilasa por hibridación Southern utilizando el sistema de etiquetado y detección de Roche Applied Science, Indianápolis, IN 46250-0414 EE.UU. Una sonda homóloga que se usó se aisló en un procedimiento de 2 etapas. Primero, se aisló un fragmento interno del gen de GA de *Monascus kaoliang* por PCR del molde de la biblioteca de ADNc usando cebadores degenerados diseñados a partir de fragmentos de aminoácidos que resultó en MS/LC: Deg.FW: 5'-GAYTAYTTYTAYACNTGG-3' (SEC ID NÚM:7) y Deg.RV: 5'-YTGRANACRTCDTCNGG-3' (SEC ID NÚM:8). En la etapa siguiente, se aisló una sonda homóloga por PCR usando los cebadores homólogos derivados de los fragmentos anteriormente mencionados: sonda de MkGA FW: 5'-CTGGTCAATGGTGACGTGAATC-3' (SEC ID NÚM:9) y sonda de MkGA RV: 5'-GCAATACCCGAGTTGAGAGAGTAG-3' (SEC ID NÚM:10). Veintitrés (23) de las 2920 de estas colonias produjeron una señal de hibridación positiva, y se confirmó que contenían fragmentos de ADNc de glucoamilasa por análisis de secuencias. Los resultados del análisis de secuencias de estos fragmentos de ADNc de glucoamilasa demostraron que hubo dos variantes de glucoamilasa distintas. Una primera variante más larga, denominada en este documento glucoamilasa II, codifica la glucoamilasa con un dominio de unión a almidón (SBD), y una segunda variante más

corta, denominada en este documento glucoamilasa I, codifica una glucoamilasa sin SBD (SEC ID NÚM 2 y SEC ID NÚM 5, respectivamente).

La diferencia entre las dos variantes es un hueco de 162 pares de bases al final de la región enlazadora que separa el núcleo catalítico y el SBD (SEC ID NÚM 3 y SEC ID NÚM 6). Este hueco en la secuencia resulta en un desplazamiento del marco de lectura de +1 a +3, y en consecuencia, una terminación preliminar de la traducción parece explicar las dos formas de glucoamilasa. Además, se descubrió que una mutación extra en el ADNc de glucoamilasa II produce una sustitución de aminoácidos de Prolina por Alanina en la posición 507 (A507P).

Para obtener más información sobre las posiciones de los intrones y del origen de las 2 especies de ADNc, se realizó una reacción PCR en ADN genómico usando cebadores específicos comenzando por el primer codón de partida hasta el codón finalizador del SBD: MkGA FW: 5'-ATGATTGACACAAAACCGACTGATATCGTCTC-3' (SEC ID NÚM:11) y MkGA RV: 5'-CTACTTCCAGCTGTCGTTGACGGTCAC-3' (SEC ID NÚM:12). La reacción se efectuó en un ciclador térmico MJ Research PTC-200 Peltier usando ADN polimerasa Taq Platinum® Taq de alta fidelidad de Invitrogen (Cat# 11304-011) según los protocolos del proveedor. Todo el producto de la reacción PCR se purificó usando el kit de purificación de PCR Qiagen QIAquick® (Cat# 28106) según el protocolo del fabricante. La reacción PCR exhibió dos bandas en un gel, en donde las bandas eran de aproximadamente 2,1kb y 2,3kb de largo (no se muestran). Los análisis de secuencias demostraron que ambos fragmentos genómicos codifican las formas de glucoamilasa I y II (SEC ID NÚM 4 y SEC ID NÚM 1, respectivamente). Dentro de las secuencias de exones, estos fragmentos demostraron 100% de identidad con los clones de ADNc correspondientes anteriormente descritos. La alineación de secuencias permitió la identificación de 4 intrones dentro del gen de glucoamilasa II más largo. El gen de glucoamilasa I más corto carece exactamente del mismo tramo de 162 pares de bases al final del enlazador, y porta la mutación en la posición 507 como el clon de ADNc más corto. En función de estos resultados se puede concluir que el genoma de *Monascus kaoliang* contiene dos genes de glucoamilasa muy relacionados que codifican una proteína con y sin el SBD. También se descubrió que ambos genes dentro de la región de superposición son prácticamente idénticos, excepto por el cambio de un solo nucleótido.

Ejemplo 3

Uso de glucoamilasa de *Monascus kaoliang* a partir de caldo de fermentación en la fermentación de etanol convencional

El uso de glucoamilasa de *M. kaoliang* para sacarificar almidón licuado y dar soporte a la fermentación de etanol se comparó con una glucoamilasa de *Aspergillus niger*.

Se llevó a cabo un ensayo de fermentación de etanol de la siguiente manera: Se descongeló liquefact congelado (almidón licuado que tiene 32% de contenido sólido seco (DS)) a 75°C, y luego se llevó a temperatura ambiente con un pH medido de 5,6. Se proporcionaron levadura y etanol de Red Star Yeast Company. El Liquefact se dispense luego en cantidades de 150 gramos en matraces de 250 ml Erlenmeyer. Se añadieron a cada matraz 500 ml de una disolución de levadura/agua al 20% y 600 ml de disolución de urea/agua al 10% (400 ppm). Las enzimas se dosificaron de acuerdo con el diseño experimental de la Tabla 3. Como la actividad de la MkGA fue relativamente baja, fue necesario un gran volumen para lograr la dosis deseada. Se añadió agua a los matraces para mantener los volúmenes constantes. Los matraces se incubaron a 32°C en un agitador de aire forzado a 150 rpm.

Tabla 3

Matraz	Descripción	µl GA	µl agua	µl total	unidades de glucoamilasa (GAU)
1 y 2	AnGA	32,0	2101,0	2133,0	15,6
3 y 4	MkGA@0,325	1733,0	400,0	2133,0	15,6
5 y 6	MkGA @ 0,40	2133,0	0	2133,0	19,2
AnGA: Glucoamilasa de <i>Aspergillus niger</i> (487 unidades de glucoamilasa/g)					
MkGA: Preparación de glucoamilasa de <i>Monascus kaoliang</i> I y II (9 unidades de glucoamilasa/g)					

Se tomaron muestras de cada matraz en intervalos programados para análisis de HPLC y al final de la fermentación para análisis de almidón.

Para el análisis de HPLC, las muestras primero se centrifugaron, se diluyeron 1:10 en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M, se calentaron a 75°C por 15 minutos y se filtraron a través de un filtro de 0,45 micrómetros. Se inyectó una muestra de 10 microlitros en una columna de ácido orgánico de HPLC Phenomenex Rezex conectada a un detector de índice refractario, en donde las condiciones de ejecución de la HPLC de 23 minutos fueron: 65°C con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N como la fase móvil.

Para análisis de almidón residual insoluble (IRS), se dispuso una alícuota de 100 g de caldo de fermentación en un Erlenmeyer de 250 ml mientras se agitaba con una varilla agitadora, la muestra se calentó a punto de ebullición

durante 10 minutos y luego se centrifugó (Caliente). El sobrenadante decantó, se dejó enfriar en hielo durante 10 minutos y después se calentó hasta temperatura ambiente. Se añadió luego una muestra de 1,0 ml del sobrenadante a 14 ml de H<sub>2</sub>O destilada en un tubo de ensayo volumétrico de 15 ml, y el residuo de almidón insoluble se dejó reposar durante la noche. El volumen de almidón sedimentado se evaluó visualmente.

5

Tabla 4

Datos de HPLC promedio										
Matraz	Descripción	h	% P/V DP>3	% P/V DP-3	% P/V DP-2	% P/V DP-1	% P/V Láctico	% P/V Glicerol	% P/V Acético	% V/V Etanol
1,2	AnGA	17	7,68	0,10	4,08	2,98	0,12	1,22	0,04	7,91
		24	6,19	0,15	1,48	2,89	0,12	1,35	0,05	10,21
		40	1,21	0,16	0,26	2,07	0,08	1,45	0,08	13,70
		48	0,78	0,13	0,35	1,05	0,06	1,48	0,09	14,41
3,4	MGA @ 0,325	17	8,55	0,09	4,21	0,46	0,15	1,20	0,04	8,88
		24	7,50	0,11	1,77	0,19	0,14	1,26	0,05	10,85
		40	3,51	0,17	0,12	0,05	0,09	1,30	0,08	14,00
		48	2,74	0,16	0,11	0,03	0,07	1,31	0,09	14,29
5,6	MGA @ 0,40	17	8,18	0,08	3,16	1,09	0,13	1,23	0,05	9,48
		24	6,68	0,15	0,58	0,25	0,12	1,29	0,07	11,99
		40	2,48	0,15	0,12	0,04	0,06	1,32	0,09	14,46
		48	2,07	0,14	0,11	0,03	0,05	1,31	0,09	14,36

Como se observa en la Tabla 1 y en la Figura 5, se obtuvo una velocidad más rápida de la fermentación de etanol usando glucoamilasa de *M. kaoliang* (MkGA) que con glucoamilasa de *A. niger*, cuando se compararon en base a un número equivalente de unidades de glucoamilasa (GAU)/g sólidos secos (DS) de dosis de almidón licuado, indicando una mejor eficiencia de la conversión de carbono. Los resultados finales del alcohol producido usando las dos glucoamilasas fueron comparables, a aproximadamente 14,3%.

10

La cantidad de almidón residual insoluble (IRS) remanente después de la fermentación de etanol del almidón licuado en presencia de glucoamilasa fue mayor para la glucoamilasa de *M. kaoliang* (MkGA) que para la glucoamilasa de *A. niger* cuando se compararon en base a 0,325 GAU/g DS. No obstante, un incremento de 25% en la dosis de MkGA (0,4 GAU/g DS) dejó niveles similares de IRS a 0,325 GAU/g DS de AnGA (Figura 6).

15 Ejemplo 4

Uso de glucoamilasa de *Monascus kaoliang* a partir del caldo de fermentación en la etapa de fermentación de elaboración de cerveza

El uso de glucoamilasa de *M. kaoliang* para sacarificar carbohidratos de mosto y dar soporte a la fermentación de etanol se comparó con DIAZYME® X4, que comprende una glucoamilasa de *Aspergillus niger* (AnGA). Los ensayos de fermentación se realizaron usando mosto con lúpulo preparado con el kit Bitter Home Brew de Munton's, que tiene una gravedad específica inicial de 1056,7 (es decir, 13,92 °Plato). Se añadieron 200 ml del mosto a cada matraz de 500 ml (recipiente de fermentación; FV), que luego se sometió a una autoclave a 99°C durante 10 minutos y después se enfrió. Se realizaron las siguientes adiciones a los matraces:

20

- Los matraces de control negativo recibieron 1 ml de agua estéril;

25

- Los matraces de control positivos recibieron 1 ml de una dilución de 100 veces de DIAZYME® X4 (glucoamilasa concentrada derivada de una cepa de *Aspergillus niger*) provista por Genencor International, equivalente a una velocidad de adición de 5 g DIAZYME® X4 por hl de adición de mosto;

- Los matraces de ensayo recibieron 1 ml de 2,9 g → 5 ml de dilución de la glucoamilasa de *Monascus kaoliang*, equivalente a la misma velocidad de adición, en términos de unidades de actividad de glucoamilasa añadida por hl de adición de mosto, que aquella utilizada para DIAZYME® X4 en el control positivo.

5 Cada matraz se dosificó con levadura W34/70 (Weihenstephan) a una velocidad de 10,106 por ml por °Plato, la fermentación se dejó proceder bajo condiciones de ensayo de laboratorio estandarizadas (una temperatura elevada de 22,5 °C, con agitación moderada de 100 rpm, en un incubador orbital por hasta 165 horas). Cada matraz se analizó en intervalos programados con respecto a pérdida de peso y gravedad específica, mientras que el grado real de fermentación (RDF, que es la atenuación real expresada en forma de porcentaje) se calculó para el mosto fermentado final (cerveza), y una muestra se sometió a análisis HPLC de la composición de carbohidratos y los productos de fermentación, empleando los métodos expuestos en el Ejemplo 3. La gravedad específica del mosto antes, durante y después de la fermentación se midió usando un hidrómetro de gravedad específica o un medidor de densidad Anton-Paar (p. ej., DMA 4100 M) y la atenuación real se calculó y expresó en forma de porcentaje como RDF de acuerdo con las fórmulas enumeradas por Ensminger (véase <http://hbd.org/ensminger/> "Beer data: Alcohol, Calorie, and Attenuation Levels of Beer"). El control de la pérdida de peso durante la fermentación proporciona una medida indirecta de la evolución de CO<sub>2</sub> y en consecuencia de la formación de etanol.

Tabla 5

Ensayo de fermentación : Adición de MkGA o DIAZYME® X4 al FV									
Enzima(s) añadida	Velocidad de dosis	S.G. inicial	Sólidos	RDF	S.G. final	Extracto real	Glicerol final	Etanol final	
	(g/hl)		(% Plato)	(%)		(%)	(% p/v)	(% v/v)	
<b>Control (sin enzima)</b>		1,057	13,923	63,280	1,012	5,112	0,243	5,452	
		1,057	13,923	63,132	1,013	5,133	0,247	5,326	
		1,057	13,923	63,429	1,012	5,092	0,239	5,349	
		1,057	13,923	63,280	1,012	5,112	0,242	5,380	
	<b>promedio</b>	<b>1,057</b>	<b>13,923</b>	<b>63,280</b>	<b>1,012</b>	<b>5,112</b>	<b>0,243</b>	<b>5,377</b>	
	<b>Desv. estándar</b>	0,000	0,000	0,122	0,000	0,017	0,003	0,055	
	UL	1,057	13,923	63,474	1,013	5,139	0,248	5,464	
	LL	1,057	13,923	63,087	1,012	5,085	0,237	5,290	
<b>DIAZYME® X4 (Lote # 1681046910) 409,9 GAU/g</b>		5	1,057	13,923	79,948	1,001	2,792	0,256	6,612
		1,057	13,923	80,403	1,001	2,728	0,267	6,742	
		1,057	13,923	79,797	1,001	2,813	0,283	6,783	
		1,057	13,923	79,645	1,002	2,834	0,272	6,806	
	<b>promedio</b>	<b>1,057</b>	<b>13,923</b>	<b>79,948</b>	<b>1,001</b>	<b>2,792</b>	<b>0,270</b>	<b>6,736</b>	
	<b>Desv. estándar</b>	0,000	0,000	0,327	0,000	0,046	0,011	0,087	
	UL	1,057	13,923	80,469	1,002	2,864	0,287	6,874	
	LL	1,057	13,923	79,428	1,001	2,719	0,252	6,598	
<b>MkGA 409,9 GAU equiv.</b>		5	1,057	13,923	77,376	1,003	3,150	0,278	6,250
		1,057	13,923	77,679	1,003	3,108	0,260	6,207	
		1,057	13,923	77,830	1,003	3,087	0,271	6,616	
		1,057	13,923	78,435	1,002	3,002	0,258	6,673	
	<b>promedio</b>	<b>1,057</b>	<b>13,923</b>	<b>77,830</b>	<b>1,003</b>	<b>3,087</b>	<b>0,267</b>	<b>6,437</b>	
	<b>Desv. estándar</b>	0,000	0,000	0,445	0,000	0,062	0,009	0,242	
	UL	1,057	13,923	78,538	1,003	3,185	0,282	6,821	
	LL	1,057	13,923	77,122	1,002	2,988	0,251	6,052	

20 El análisis de la cerveza final, producido por fermentación en presencia de un número equivalente de unidades de glucoamilasa de MkGA en comparación con DIAZYME® X4, reveló que la glucoamilasa MkGA produjo un rendimiento ligeramente inferior con respecto a la producción de etanol, pérdida de peso (producción de CO<sub>2</sub>) y RDF (véanse las Tablas 5-7 y la Fig. 7). De manera correspondiente, el contenido de oligosacáridos que tienen una polimerización de DP4 y superior se elevó en la cerveza final producida con glucoamilasa MkGA. Estos resultados demuestran claramente que DIAZYME® X4 puede sustituirse con glucoamilasa MkGA para generar carbohidratos fermentables en el mosto para dar soporte a la fermentación de etanol. Es probable que un incremento de la dosis de glucoamilasa MkGA en el recipiente de fermentación resista velocidades de producción de etanol similares o

ES 2 616 917 T3

mayores que aquella de DIAZYME® X4, en función de la producción mejorada de etanol observada con las velocidades de dosis mayores de MkGA expuestas en el Ejemplo 3.

Tabla 6

Análisis HPLC de carbohidratos de los mostos fermentados								
Enzima(s) añadidas	Índice de dosis	DP1 Fructosa	DP1 Glucosa	DP2	DP3	DP4+	Total	
	(g/hl)	(% p/v)						
<b>Control (sin enzima)</b>		0,055	0,044	0,191	0,360	2,783	3,432	
		0,066	0,042	0,189	0,366	2,830	3,493	
		0,070	0,045	0,169	0,360	2,750	3,394	
		0,065	0,041	0,173	0,347	2,761	3,387	
	<b>Promedio</b>	<b>0,064</b>	<b>0,043</b>	<b>0,180</b>	<b>0,358</b>	<b>2,781</b>	<b>3,426</b>	
	<b>Desv. estándar</b>	0,006	0,002	0,011	0,008	0,035	0,049	
	<b>UL</b>	0,074	0,046	0,198	0,371	2,837	3,504	
	<b>LL</b>	0,054	0,040	0,162	0,346	2,725	3,349	
<b>DIAZYME® X4 (Lote # 1681046910) 409,9 GAU/g</b>		5	0,048	0,033	0,200	0,289	0,637	1,208
		0,047	0,032	0,183	0,284	0,633	1,179	
		0,049	0,031	0,186	0,291	0,655	1,212	
		0,050	0,031	0,202	0,302	0,652	1,237	
	<b>Promedio</b>	<b>0,048</b>	<b>0,032</b>	<b>0,193</b>	<b>0,291</b>	<b>0,644</b>	<b>1,209</b>	
	<b>Desv. estándar</b>	0,001	0,001	0,010	0,008	0,011	0,024	
	<b>UL</b>	0,050	0,034	0,208	0,304	0,662	1,246	
	<b>LL</b>	0,047	0,030	0,177	0,279	0,627	1,171	
<b>MkGA 409,9 GAU equiv.</b>		<b>5</b>	0,058	0,037	0,220	0,318	0,835	1,467
		0,058	0,037	0,224	0,323	0,830	1,472	
		0,059	0,037	0,217	0,338	0,885	1,535	
		0,057	0,035	0,159	0,287	0,808	1,346	
	<b>Promedio</b>	<b>0,058</b>	<b>0,036</b>	<b>0,205</b>	<b>0,316</b>	<b>0,840</b>	<b>1,455</b>	
	<b>Desv. estándar</b>	0,001	0,001	0,031	0,021	0,032	0,079	
	<b>UL</b>	0,059	0,038	0,254	0,350	0,891	1,581	
	<b>LL</b>	0,056	0,034	0,156	0,282	0,788	1,329	

ES 2 616 917 T3

Tabla 7A

Datos de pérdida de peso									
Matraz	Enzima	Peso del matraz (g)							
		Vacio	Comienzo	24 h	48 h	117 h	144 h	165 h	
1	Control (sin enzima)	178,06	389,1	383,7	380,9	380,4	380,3	380,37	
2		171,82	383,1	376,7	374,8	374,4	374,3	374,38	
3		171,88	385,2	377	376,6	376,2	376,2	376,27	
4		172,92	384,5	378	376,2	375,8	375,7	375,74	
5	DIAZYME® X4 (Lote # 1681046910) 409,9 GAU/g	171,3	383,4	376,2	373,8	372,6	372,3	372,32	
6		179,29	391,4	383,3	381,6	380,4	380,2	380,22	
7		160,74	372,4	365,4	362,9	361,7	361,5	361,45	
8		178,86	390,2	383,9	380,8	379,6	379,3	379,26	
9	MkGA 409,9 GAU equiv.	162,03	374	368,5	364,6	363,5	363,3	363,26	
10		173,02	384,5	378,5	375,1	374	373,8	373,76	
11		177,48	388,8	382,5	379,4	378,3	378,1	378,05	
12		175,28	387,7	379,5	377,9	377	376,7	376,74	

Tabla 7B

Datos de pérdida de peso (% del peso inicial)								
Enzima(s) añadidas		Velocidad de dosis	Pérdida de peso (%) a:					
		(g/hl)	0	24	48	117	144	165
Control (sin enzima)			0.00%	2.56%	3.89%	4.12%	4.17%	4.14%
			0.00%	3.03%	3.93%	4.12%	4.17%	4.13%
			0.00%	3.84%	4.03%	4.22%	4.22%	4.19%
			0.00%	3.07%	3.92%	4.11%	4.16%	4.14%
		<b>Promedio</b>	<b>0.00%</b>	<b>3.13%</b>	<b>3.94%</b>	<b>4.14%</b>	<b>4.18%</b>	<b>4.15%</b>
		<b>Desv. estándar</b>	0.00000	0.00532	0.00063	0.00051	0.00028	0.00026
		<b>UL</b>	0.00%	3.97%	4.04%	4.22%	4.22%	4.19%
		<b>LL</b>	0.00%	2.28%	3.84%	4.06%	4.13%	4.11%
DIAZYME® X4 (Lote # 1681046910) 409,9 GAU/g			0.00%	3.39%	4.53%	5.09%	5.23%	5.22%
			0.00%	3.82%	4.62%	5.19%	5.28%	5.27%
			0.00%	3.31%	4.49%	5.06%	5.15%	5.17%
			0.00%	2.98%	4.45%	5.02%	5.16%	5.18%

Datos de pérdida de peso (% del peso inicial)								
Enzima(s) añadidas		Velocidad de dosis	Pérdida de peso (%) a:					
		<b>Promedio</b>	<b>0.00%</b>	<b>3.38%</b>	<b>4.52%</b>	<b>5.09%</b>	<b>5.21%</b>	<b>5.21%</b>
		<b>Desv. estándar</b>	0.00000	0.00345	0.00074	0.00073	0.00063	0.00046
		<b>UL</b>	0.00%	3.92%	4.64%	5.20%	5.30%	5.28%
		<b>LL</b>	0.00%	2.83%	4.40%	4.97%	5.11%	5.14%
<b>MkGA 409.9 GAU equiv.</b>		<b>5</b>	0.00%	2.59%	4.43%	4.95%	5.05%	5.07%
			0.00%	2.84%	4.44%	4.97%	5.06%	5.08%
			0.00%	2.98%	4.45%	4.97%	5.06%	5.09%
			0.00%	3.86%	4.61%	5.04%	5.18%	5.16%
		<b>Promedio</b>	<b>0.00%</b>	<b>3.07%</b>	<b>4.49%</b>	<b>4.98%</b>	<b>5.09%</b>	<b>5.10%</b>
		<b>Desv. estándar</b>	0.00000	0.00552	0.00086	0.00038	0.00061	0.00042
		<b>UL</b>	0.00%	3.95%	4.62%	5.04%	5.18%	5.16%
		<b>LL</b>	0.00%	2.19%	4.35%	4.92%	4.99%	5.03%

## Ejemplo 5

Purificación de MkGA I y MkGA II y su uso en la etapa de fermentación de la elaboración de cerveza

Purificación:

- 5 Se desarrolló CBS302.78 de *Monascus kaoliang* en placas de agar PDA. Para iniciar la fermentación del pre-cultivo se usa una pieza (~1 cm<sup>2</sup>) de una placa PDA con CBS302.78 de *M. kaoliang* para inocular 50 ml de medio LD-maltosa en un matraz de agitación desviador estéril de 250 ml. El cultivo se desarrolló durante 2 días a 28°C y se cosechó. Se transfirieron 50 ml de este cultivo a 1000 ml de medio LD-maltosa en un Fernbac desviador de 2,8 l y se incubó 4 días a 28°C con pH fijado a 5,0 o 5,5. El cultivo celular se cosechó y se aclaró el medio por centrifugación (4000 rpm a 15 min.) y filtración (VacuCap 90, 0,2 mm). Después, el fermento se concentró y conservó a -20°C.
- 10 Se purificaron MkGA I y MkGA II de la siguiente manera: el caldo de fermentación clarificado se trató con carbono activo para eliminar el exceso de pigmentos de *Monascus kaoliang* segregados tales como: Monascina, ankaflavina y monascorubrina. Por lo tanto, al caldo de fermento se le añadió 2% (p/v) Norit SA Plus y se dejó agitar a TA durante 20 min. Esta suspensión se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min. y se filtró (0,2 mm) antes de diluirla 1:4 con tampón A (Na-Acetato 25 mM pH 4,3) utilizado para la primera columna. La cromatografía se llevó a cabo
- 15 manualmente en un sistema de FPLC BioRAD. Se efectuó una columna de 15 ml de β-ciclodextrina inmovilizando β-ciclodextrina (Sigma-Aldrich; CAS nr:68168-23-0) en Sepharose™ 6B activada con epoxi (GE Healthcare; Lote: 10021987). Esta columna de β-CD se equilibró con tampón A a un caudal de 2 ml/min. Este caudal se mantuvo durante toda la purificación. La muestra que contenía 500 M-GAU se cargó en una columna a través del tubo de entrada y las fracciones de 10 ml se recogieron durante la purificación. Se pudo recoger MkGA I en el flujo y el
- 20 tampón se intercambió a 100% tampón B (α-ciclodextrina 10 mM en Na-acetato 25 mM pH 4,3) después de la estabilización de la situación inicial por lavado extensor con el tampón A. La MkGA II ligada se eluyó de la columna y el tampón se volvió a intercambiar finalmente a A después de eluir toda la proteína. La proteína en el flujo y la elución se analizaron para actividad de glucoamilasa y por SDS-page.
- 25 Todos los geles SDS-page se efectuaron con el gel Invitrogen NuPage® Novex 10% Bis-Tris 1,0 mm, 10 pocillos (Cat#NP0321 caja), véanse estándar pre-teñido Blue® Plus2 (Cat# LC5925) y tampón de corrida NuPAGE® MES SDS (Cat# NP0002) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Tinción con azul de Coomassie brillante.
- Las fracciones que contenían MkGA I y MkGA II se mezclaron por separado y se eliminó la α-ciclodextrina pasando la muestra por columnas PD10. Las fracciones que contenían GA se concentraron en tubos centrifugos de ultrafiltración Vivaspin™ hasta aproximadamente 20 mg/ml (25 ml, 10K MWCO, Sartorius).
- 30 El flujo de la columna de β-ciclodextrina con MkGA I contuvo cantidades pequeñas de MkGA II (<10%) y se purificó adicionalmente. La muestra de MkGA I se cambió a tampón C (tampón de citrato 20 mM pH3,5) por diálisis extensiva. Se cargaron 4 ml de muestra (correspondientes a 100 GAU) en una columna SPFF HiTrap de 1 ml

equipada en un sistema Äkta Pharmacia FPLC (GE Healthcare) pre-equilibrado con tampón C y operando con un flujo de 1 ml/min. Las proteínas ligadas se separaron con un gradiente de 20 CV en 50% tampón D (tampón de citrato 20 mM pH 3.5, NaCl 1 M). Las fracciones pico se recogieron y analizaron para actividad de glucoamilasa y por SDS-page. De este modo, se obtuvieron MkGA I y MkGA II completamente puras.

- 5 La secuencia de aminoácidos de las MkGA I y MkGA II purificadas se obtuvo por análisis MS (SEC ID NÚM. 6 y SEC ID NÚM. 3) y concordó con las secuencias de ADNc traducidas.

Se ensayó la actividad de glucoamilasa con un ensayo Megazyme R-AMGR3 (M-GAU) de acuerdo con la descripción del fabricante (véase ejemplo 6). La dilución y el mezclado se efectuaron en placas ELISA de 96 pocillos en un aparato Biomek 3000 (Beckman Coulter).

- 10 Análisis del proceso de elaboración de cerveza:

MkGA I, MkGA II, AnGA (DIAZYME® X4) y TrGA se ensayaron en experimentos de elaboración de cerveza. En esta configuración, se prepara un mosto usando extracto de malta Munton's. Se disolvieron 340 g de extracto de malta Munton's en 1500 ml de agua caliente. A esta suspensión se le añadieron 5 gránulos de lúpulos, se ajustó el pH a 5,2 por H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se sometió a ebullición durante 1 hora antes de someterse a una autodave a 121°C durante 15 minutos. Después, a 0,6 g de levadura W34/70 (Weiherstephan) recién producida se le añadieron 100 g de mosto enfriado junto con las distintas enzimas. Las enzimas se dosificaron en cantidad similar de proteína (0,066 mg GA/ml de mosto) o actividad de β-D-maltósido similar (0,16 M-GAU/ml de mosto).

Los mostos se fermentaron a 18°C y se agitaron moderadamente a 150 rpm en matraces cónicos de 500 ml. La actividad residual se midió antes y después de la fermentación. La producción de etanol se midió indirectamente por la pérdida de peso de los fermentos. El alcohol se midió en un medidor de densidad Anton-Paar (p. ej., DMA 4100 M) y se calculó la atenuación real y se expresó en forma de porcentaje como RDF de acuerdo con las fórmulas mencionadas por Ensminger (véase <http://hbd.org/ensminger/> "Beer data: Alcohol, Calorie, and Attenuation Levels of Beer").

Análisis de carbohidratos de mosto fermentado:

25 Las muestras retiradas de la fermentación se analizaron en un sistema de HPLC Gilson con un automuestreador Gilson 234. Los parámetros de HPLC fueron los siguientes: fase móvil: agua Milli-Q, flujo: isocrático, 1ml/min, Columna: Phenomenex RSO - Oligosacárido, temperatura de la columna: 75°C, volumen de inyección: 20 ml, Detector: índice refractario (detector RI Laserchrom Schambeck), Integración: Manual, preparación de la muestra: dilución 2 veces en agua Milli-Q (2,5 ml de muestra + 2,5 ml de agua) y filtración a través de filtros de jeringa de 0,45 mm, cuantificación: áreas del pico en porcentaje de área del pico del estándar. Se cuantificaron las siguientes muestras: etanol, glicerol, glucosa, DP2, DP3, DP4, DP4+ (todas encimas e incluyendo DP4) y DP1-4+.

Como se observa en la tabla 8, el efecto de MkGA I fue superior a MkGA II en ambos experimentos de dosis y demostró ser comparable dentro del error experimental con el efecto obtenido usando o bien AnGA o TrGA.

Tabla 8

		Análisis de elaboración de cerveza – dosificada en proteína 0,066 mg GA/ml mosto		Análisis de elaboración de cerveza – dosificada en actividad 0,16 M- GAU/ml mosto	
		RDF (%)	Estándar	RDF (%)	Estándar
MkGA I	<i>M. kaoliang</i>	77,81	0,130	77,73	0,255
MkGA II	<i>M. kaoliang</i>	77,03	0,141	77,28	0,156
AnGA (DIAZYME® X4)	<i>A. niger</i>	77,42	0,203	78,19	0,184
TrGA	<i>T. reesei</i>	77.71	0.205	77.85	0.141

- 35 Tabla 8. Valores RDF determinados para las GA mencionadas al FV en las dosis indicadas, usando un mosto de extracto de malta. Los resultados son un promedio de 3 determinaciones.

De acuerdo con los valores RDF obtenidos, MkGA I, MkGA II y DIAZYME® demostraron un recambio muy similar de oligosacáridos en el mosto durante el periodo de fermentación (96 h) (Fig. 8). La única diferencia notable es que DIAZYME® X4 demuestra un consumo inicial ligeramente más rápido de oligosacáridos DP3 y DP4+ en

comparación con MkGA I y MkGA II. Esto, no obstante, no afecta el resultado final de la composición de oligosacáridos residual y los valores RDF obtenidos.

Ejemplo 6

Termoestabilidad de MkGA I y MkGA II en tampón y en cerveza:

- 5 La actividad de glucoamilasa de MkGA I, MkGA II, DIAZYME® X4 (AnGA) y TrGA se determinó en cerveza pH(4,3 – 4,6) y en tampón de Na-Acetato pH(4,7) usando un ensayo de pasteurización a escala de laboratorio (en el intervalo de 0 a 42 PU).

Determinación de la actividad de M-GAU:

El ensayo es una versión a escala de ELISA del ensayo Megazyme R-AMGR3.

- 10 Sustrato: p-Nitrofenil-β-maltósido (4 mM), más β-glucosidasa termoestable (5 U/ml): se disuelven los contenidos de un vial en 10 ml de agua milli-q, se divide en alícuotas de 1ml y se conserva congelado.

Tampón: tampón de acetato de sodio 200 mM (pH 4,5). Se añaden 5,9 m de ácido acético glaciar (1,05 g/ml) a 900 ml de agua milli-q. Se ajusta el pH hasta pH 4,4 por adición de disolución de NaOH 1 M (4 g/100 ml) (se requieren aprox. 30 ml). Se ajusta el volumen hasta 1 l y se conserva en un frasco bien cerrado a 4°C.

- 15 Se diluyen muestras enzimáticas por un factor 10 en tampón de acetato sódico (se diluyen más con el mismo tampón si es necesario, pero cabe recordar que la primera dilución es siempre necesaria para llevar el pH a 4,5). En una placa de 96 pocillos: se mezclan 20 µl de sustrato con 20 µl de disolución enzimática y se incuban a 40°C con agitación durante 10 minutos. Se añaden 300 µl de 2% base de Trizma para finalizar la reacción y desarrollar el color.

- 20 Se mide la absorbancia a 400 nm contra un testigo reactivo. Los testigos se preparan añadiendo 300 µl de disolución base Trizma (2%) a 20 µl de sustrato con agitación vigorosa, seguida de disolución de enzima (20 µl). La actividad se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Actividad (GAU/ml)} = \frac{\Delta A_{400}}{10} \cdot \frac{340}{20} \cdot \frac{1}{18,1} \cdot \frac{1}{0,88} \cdot \text{Dilución}$$

- 25 En donde: GAU = unidades de actividad de glucoamilasa. Una unidad es la cantidad de GA que libera un mmol de p-nitrofenol del sustrato por minuto al pH y la temperatura definidos. ΔA400 = absorbancia (reacción) - Absorbancia (testigo). 10 = tiempo de incubación (min). 340 = volumen de reacción final (µl). 20 = volumen de enzima ensayada (µl) 18,1 = E mM p-nitrofenol en 2% base trizma (pH ~ 8,5) at 400 nm (unidad: µM-1\*cm-1). 0,88 = trayecto de luz (cm)

Ensayo de pasteurización:

- 30 La pérdida relativa de actividad de glucoamilasa se determinó en cerveza desgasada o tampón de acetato en un ensayo de pasteurización a escala de laboratorio. La muestra se diluyó 1:10 en cerveza o tampón y se transfirió a una cubeta de vidrio delgado y se dispuso en un baño de agua a 72°C en donde se midieron el tiempo y la temperatura. Las muestras se retiraron con el transcurso del tiempo (0 a 100 seg) y se mantuvieron en hielo antes de determinar la actividad residual. La dilución y el mezclado se realizaron en placas ELISA de 96 pocillos en un Biomek 3000 (Beckman Coulter). Para medir la termoestabilidad enzimática bajo las condiciones utilizadas en los presentes experimentos, se determinó la actividad de GAU antes y después de la incubación de las enzimas. Se usó cerveza o tampón como testigo. La energía acumulada se convirtió a unidades de pasteurización PU, un índice de energía equivalente, con la ecuación expuesta arriba. Los datos se presentan como la pérdida de actividad relativa.

- 40 La termoestabilidad se determinó en Pilsner desgasada regular (Royal Export Pilsner) pH (4,5) para MkGA I, MkGA II, MkGA I+MkGA II, DIAZYME® X4 (AnGA) y TrGA. A partir de los resultados de la tabla 9, se observa que MkGA I es significativamente más termolábil que las otras glucoamilasas ensayadas en la cerveza Pilsner. MkGA I se inactiva completamente con menos de 26 unidades de pasteurización (PU) usando una temperatura de pasteurización de 72°C. En comparación, la MkGA II requiere 100 PU, y AnGA y TrGA necesitan más de 200PU para ser inactivadas. Notablemente, MkGA I se trunca y carece del SBD en comparación con MkGA II, AnGA y TrGA
- 45 que tienen todas la misma estructura de dominio con un dominio catalítico y un SBD.

Tabla 9

		Actividad de glucoamilasa residual en cerveza después de la pasteurización a 72°C				
Unidades de pasteurización [PU]	ID muestra	MkGA I <i>M. kaoliang</i> (purificada)	MkGA II <i>M. kaoliang</i> (purificada)	MkGA I+MkGA II <i>M. kaoliang</i> (fermento)	AnGA (DIAZYME® X4) <i>A. niger</i> (producto)	TrGA <i>T. reesei</i> (fermento)
0,000	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
0,020	2	0,840	0,895	0,910	0,974	0,956
0,180	3	0,122	0,700	0,375	0,857	0,945
2,190	4	0,036	0,547	0,144	0,774	0,898
6,770	5	0,021	0,230	0,074	0,561	0,612
13,16	6	0,004	0,110	0,020	0,474	0,471
26,81	7	0,000	0,031	0,002	0,349	0,271
48,69	8	0,000	0,015	0,002	0,225	0,202
75,20	9	0,000	0,002	0,000	0,164	0,153
102,2	10	0,000	0,000	0,000	0,125	0,114

Tabla 9. Actividad de glucoamilasa residual después de incrementar la pasteurización a 72°C en cerveza de MkGA I, MkGA II, MkGA I+MkGA II (MkGA), AnGA ((DIAZYME® X4) y TrGA. La actividad residual se calcula como la actividad real dividida con la actividad inicial (0 PU) y los resultados son un promedio de 3 determinaciones.

- 5 Además, las pasteurizaciones a 72°C se realizaron en cervezas con gravedad específica ampliamente distinta (es decir, °Plato): Budweiser Pilsner pH (4.5), Newcastle Brown Ale pH(4,3), Thisted bryghus Porter pH(4,6) y Na-Acetato 0,1M pH (4,7) utilizados en los estudios previos de termoestabilidad de MkGA I y MkGA II (1). Es claro a partir de los resultados que se exponen en la Figura 9 que MkGA I y MkGA II son más termolábiles en cerveza que el tampón de Na-Acetato, mientras que la termoestabilidad de DIAZYME® X4 (AnGA) no cambia significativamente entre el tampón y la cerveza. Sorprendentemente, la actividad residual de MkGA I, que posee la termoestabilidad más baja, se reduce más rápido en cerveza, y la glucoamilasa puede inactivarse completamente en todas las
- 10 cervezas con menos de 25PU en comparación con el tampón, que mantiene una actividad residual pequeña pero significativa (2%) después de la pasteurización con 42PU. Thisted bryghus porter es la cerveza en la que MkGA I y MkGA II demuestran la más baja termoestabilidad.

#### 15 Ejemplo 7

Para expresar ambas formas de glucoamilasa de *M. kaoliang*, MkGA I y MkGA II, en el hospedante heterólogo *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei* anamorfo), ambas secuencias genómicas y de ADNc de los dos genes correspondientes se ampliaron por PCR o bien de ADN genómico de *M. kaoliang* o de una biblioteca de ADNc combinada preparada como se describió en los ejemplos anteriores con los cebadores en dirección 5' y en dirección

20 3' que se indican a continuación (SEC ID NÚM: 13-15)

directa - 5'GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCACCATGGTGAAGATCAGCATAAATCCCATC 3'(SEC ID NÚM:13),

inversa I (para MkGA II) - 5' ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTACTTCCAGCTGTCGTTGACGGTC 3' (SEC ID NÚM: 14) and

- 25 inversa II (para MkGA I) - 5' ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCACCGTCCCCTGCCATAGGGGCGTG 3'(SEC ID NÚM: 15).

Además, un fragmento adicional que codifica glucoamilasa MkGA I pero que comienza en otro codón ATG encontrado en el marco en dirección 5' del comienzo putativo de la traducción (SEC ID NÚM:17) se amplió utilizando un cebador en dirección 5':

5' GGGACAAGTTT GTACAAAAAGCAGGCTATGATTGACACAAAACCGACTGATATCGTCTC 3' (SEC ID NÚM:16)

Todos los cebadores incluyeron los sitios de recombinación específica attB1 y attB2 compatibles con una tecnología de clonación Gateway (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) para facilitar la clonación de los fragmentos ampliados o bien en el vector pDONR™ 221 o en pDONR™/Zeo seguido de una segunda reacción de recombinación con el vector de destino pTTTpyrG13 (Fig. 10). Este vector permitió la expresión de los genes de MkGA I y MkGA II en células de *H. jecorina* y se describió en el documento WO2010141779A1. Contiene el promotor derivado de *T. reesei cbhl* y regiones terminadores que promueven una fuente de expresión inducible de un gen de interés, el marcador selectivo de *Aspergillus nidulans amdS* y *pyrG* que confiere crecimiento de transformantes en acetamida como una única fuente de nitrógeno en ausencia de uridina, y las regiones de telómero de *T. reesei* que permiten el mantenimiento de plásmido no cromosómico en una célula fúngica. El promotor y las regiones terminadoras de *cbhl* están separados por el gen de resistencia a cloroanfenicol, CmR, y el gen *codB* letal para *E. coli*, flanqueado por sitios de recombinación específica bacteriófagos lambda attR1, attR2. Dicha configuración permite la selección directa de recombinantes que contienen las secuencias de *M. kaoliang* GA bajo el control de los elementos reguladores de *cbhl* en la orientación correcta mediante la reacción de recombinación de Gateway® LR. Los plásmidos de expresión final se presentan en la Fig. 11 y la identidad de las secuencias genómicas y de ADNc específicas se confirmó mediante un análisis de secuencias. Todas las etapas de clonación se realizaron de acuerdo con las recomendaciones del proveedor (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.).

Los plásmidos aislados se transformaron en la cepa *H. jecorina* Quad con cuatro celulosas principales eliminadas ( $\Delta cbh1$ ,  $\Delta cbh2$ ,  $\Delta dgl1$ ,  $\Delta egl2$ , *pyr4*-) usando un método de PEG-protoplastos descrito en otra parte (US20110020899). Los transformantes elegidos para desarrollo en medio mínimo con acetamida como fuente de nitrógeno se cosecharon, y se usó una mezcla de esporas para inocular el medio de producción de Glicina (4,7 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 33 g/l 1,4-Piperazinabis(ácido propanosulfónico), Ph 5,5, 6,0 g/l glicina, 5,0 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0 g/l CaCl<sub>2</sub>·xH<sub>2</sub>O, 1,0 g/l MgSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O, 2,5 ml/l de 400X elementos traza de *T. reesei* {5 g/l FeSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O, 1,4 g/l ZnSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O, 1,6 g/l MnSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O, 3,7 g/l CoCl<sub>2</sub>·x<sub>6</sub>H<sub>2</sub>O}, 20 g/l Glucosa, 0,6 g/l Sophorose). Después del desarrollo durante 5 días a 28C en matraces de agitación en un agitador rotatorio a 200 rpm, las muestras de cultivo se cosecharon y analizaron para producción de glucoamilasas de *M. kaoliang* mediante análisis SDS-PAGE y ensayo de actividad usando paranitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido como sustrato. El análisis SDS-PAGE y el ensayo de actividad de la glucoamilasa se efectuaron como se describió en el ejemplo 1.

Como se observa en la Fig. 12 y a continuación en la tabla 10, ambas formas de MkGA I y II se expresaron exitosamente en su forma activa en el hospedante heterólogo *H. jecorina*. Para ambos genes, solamente las secuencias genómicas resultaron en expresión detectable de las correspondientes moléculas de glucoamilasa. Se observó una expresión más pronunciada cuando se utilizó el codón ATG en dirección 3' como el inicio de la traducción, indicando que podrá ser el verdadero comienzo del péptido de señal.

Tabla 10: Actividad de glucoamilasas de *M. kaoliang* expresadas en forma heteróloga. Las muestras de fermentación se diluyeron de manera equivalente y se midió la actividad contra para-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido

Muestra	Actividad, O.D. 405 nm
Mk GAII genómica	0,68
Mk GAII ADNc	0,1
Mk GAI genómica	0,7
Mk GAI ADNc	0,084
Mk GAI genómica+ATG	0,42
Receptor	0,08

Se analizaron por MS *T. reesei* que expresan MkGA-I-II. Se llevó a cabo un análisis de secuencias parciales (que cubren 70% de la secuencia total) en proteínas maduras de *M. kaoliang* y *T. reesei* (purificadas a partir de SDS-page, véase la Fig 13) y demostró que las respectivas variantes eran 100% idénticas (no se muestra). Se examinó la termoestabilidad de MkGA-I-II de *T. reesei* (el fermento bruto) y fue muy similar a las enzimas de tipo silvestres purificadas a partir de *M. kaoliang* (Tabla 11). Cabe destacar que fue posible inactivar gMkGA I producida en *T. reesei* con menos de 42 PU.

Tabla 11. Actividad de glucoamilasa residual como una función de las unidades de pasteurización aplicadas a 72°C en cerveza de MkGA I y MkGA II de *M. kaoliang* y *T. reesei*. La actividad residual se mide en un sustrato de  $\beta$ -D-maltósido y se calcula como la actividad real dividida con la actividad inicial (0 PU) y los resultados son un promedio de 3 determinaciones.

		Actividad residual de glucoamilasa después de la pasteurización a 72°C			
Unidades de pasteurización [PU]	ID muestra	MkGA I <i>M. Kaoliang</i> (purificada)	MkGA II <i>M. Kaoliang</i> (purificada)	gMkGA I <i>T. Reesei</i> (fermento)	gMkGA II <i>T. Reesei</i> (fermento)
0,000	1	1,000	1,000	1,000	1,000
0,001	2	0,830	0,954	0,810	0,990
0,005	3	0,470	0,892	0,530	0,920
0,167	4	0,063	0,849	0,155	0,840
1,557	5	0,040	0,407	0,042	0,610
3,990	6	0,024	0,225	0,031	0,330
16,70	7	0,001	0,101	0,020	0,150
42,60	8	0,000	0,058	0,000	0,070
66,58	9	0,000	0,010	0,000	0,040
99,98	10	0,000	0,000	0,000	0,010
239,6	11	0,000	0,000	0,000	0,000
563,7	12	0,000	0,000	0,000	0,000

5 MkGA I y MkGA II expresadas tanto en *H. jecorina* como en *M. kaoliang* se ensayaron en experimentos de elaboración de cerveza. Se preparó un mosto usando extracto de malta Munton's. Se disolvieron 340 g de extracto de malta Munton's en 1500 ml de agua caliente. A esta suspensión se añadieron 5 gránulos de lúpulos, se ajustó el pH a 5,2 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se sometió a ebullición por 1 hora antes de someter a autoclave a 121°C por 15 minutos. Luego a 0,6 g de levadura Weihenstephan recién producida se le añadieron 100 g de mosto enfriado junto con las distintas enzimas (como se describió en el ejemplo 5).

10 Los mostos (normalmente 100 ml) se fermentaron a 18°C y 150 rpm en matraces cónicos de 500 ml. La actividad residual se midió antes y después de la fermentación. La producción de etanol se midió indirectamente por la pérdida de peso de los fermentos. El alcohol se midió en un analizador de alcohol Anton Paar Alcoanalyzer y se calculó el RDF en función de la gravedad específica de la cerveza y la concentración de alcohol del analizador.

15 El desempeño en la aplicación FV de cerveza de gMkGA I y gMkGA II de *T. reesei* demostró ser alto pero se redujo (en términos de valores RDF) en comparación con las proteínas purificadas de *M. kaoliang* (véase la Fig. 14). Las enzimas se dosificaron en actividad (GAU/ml) y la reducción del desempeño puede deberse a actividades secundarias en el fermento bruto de *T. reesei* en lugar de deberse a un desempeño real en el FV, ya que tienen secuencias de aminoácidos similares.

(SEC ID NÚM:1)

ADNg MkGA II

```

1 atgggtgaaga tcagcataaa tcccatcttg aaacggacat tccctctatc
51 agtgotgctg ggcgctcc tgcagcctg tcttggggct tcaaacctag
101 ctcagatcgc tgttgccgct gcaacatcgg cggagtcaag tgctgcgtct
151 gattccttag attcatggct ggccagagag actccatag ccttgatgg
201 aattttaaat aacatcggcc cagacggcgc gaaggctgtg ggtgcagtct
251 ctggcgtggg ggttgcgagt ccgagcaaga gtaatccgga ttgtgagtat
301 tctcgtatth ccagcccca acgtcaagtg catctatagc aaagaaagaa
351 aaagotcatg ctaatggatg tatctgtata tattctaca cttggactcg
401 tgacgctgct ctgactgtta aatgtctgac cgacctcttc ctgggcaatg
451 gtgacgtgaa tctgcagtcg cagatccaga actacatcag ccgccaggca
501 tatttgagaga ccgtatccaa tccatctggg gacctgtcga ctgggggact
551 tggtgagccc aaattcgagg ttgatggcgc tgcatttacc ggttcctggg
601 gcgctcctca acgagatggg cctgcgttga gggctacggc tctgattgct
651 tatgccaatt ggctcattgt aggtgtttgc atgttgatt ttcttttctt
701 tctaataata tcttctcttg ttgttacttg ctaacttcca tctacagagc
751 aatggacaga cctcgacggc ggagtccatt gtttggccag ttgtccagaa
801 tgacctttca tatgtgatgc agtattggaa ttcatctacc tttggttgt
851 cgaggcctct aaaatgggac aagcattctc agctaacgta tggaaacttc
901 atgcagacct ctgggaggaa gtctacggct catcgttttt taccacggcc
951 gtgcagcacc gtgccctagt cgaagggtgc gctttcgcca aaaagcttgg
1001 ccactcttgt cccgactgtc tctcccaggc atcgcagatc ctctgctttt
1051 tgcagtgta ctggaccggt gcttacgtgc tctctaactt tgggtggggtg
1101 cgctcaggga aggacgcca ctcgatcctc ggagttctgc atactttcga
1151 ccccgatgca gactgcgatg ataccacttt ccagccttgt tctgcccggg
1201 cgcttgcgaa ccataaagta gttacggact ctttccggtc catctactct
1251 ctcaactcgg gtattgcca gggccaagcc gtggctgtgg gacggtatcc
1301 cgaggacgct taccagggag gcaatccatg gtatctctgt actttggctg
1351 cggcggagca gctctacgac gcgctgtatc aatgggatcg aatcgggtcc
1401 ttgtctataa cggacgtcag tctgggattc ttccaggacc tgtaccctgc
1451 cgctgcagta ggtgactatg cgtcttccac ggagacatac agagatatca
1501 tggcagctgt gaaggcctat gcgaatggat atatggatat tgctgtaagg
1551 agagctcctt tccatctttt ccttgtccca tgctgaaata gtgctacaga
1601 gaaagtacac acctgccaac ggcgctctag cagagcagtt ttctagagac
1651 gatggttccc cagtctcagc ggtcgtatctg acctggctct atgcctctct
1701 tctcacggca gcagccagac gaggctccca gatgccgcca tctggaacg
1751 aatcttcttc caacaagcct ccatcgactt gctcagcacc ctctgcgacg
1801 ggggcctatg cctcggctac caacaccgctc tggcccacag cgtcgtgtgc
1851 ggcgacgccc acagccgtgc ctgtgcgttt caacgaactg gtcacgactt
1901 cagtcgggga taaggtagcc ctctggtggg ccaccctgc tctgggtca
1951 tggaatgtct ctgcggcctg cgcactgagt gcagacgaat acagcagcgt
2001 caccccccta tggcacggga cggtgagtct cccgaccaa acgagcttcc
2051 agtataagta tgtgggtcag aaggagtctg gggaaagtga ctgggagggc
2101 ggagagaatc ggtcgtacac agtgccagag ggatgcgagg gctcttcagt
2151 gaccgtcaac gacagctgga agtag

```

(SEC ID NÚM:2)

**Secuencia de ADNc de MkGA II**

```

1 atgggtgaaga tcagcataaa tcccatcttg aaacggacat tccctctatc
51 agtgetgctg ggcgcgctcc tcgcagcctg tcttggggct tcaaacctag
101 ctcagatcgc tgttgccgct gcaacatcgg cggagtcagg tgctgcgtct
151 gattccttag attcatggct ggccagagag actccatatg cccttgatgg
201 aatttttaaat aacatcggcc cagacggcgc gaaggctgtg ggtgcagtct
251 ctggcgtggg ggttgccgag ccgagcaaga gtaatccgga ttatttctac
301 acttggactc gtgacgctgc tctgactggt aaatgtctga ccgacctctt
351 cctgggtcaat ggtgacgtga atctgcagtc gcagatccag aactacatca
401 gccgccaggc atatttgagc accgtatcca atccatctgg tgacctgtcg
451 actgggggac ttggtgagcc caaattcgag gttgatggcg ctgcatttac
501 cggttcctgg ggcgctcctc aacgagatgg gcctgcggtg agggctacgg
551 ctctgattgc ttatgccaat tggctcatta gcaatggaca gacctcgacg
601 gcagattcga aattcatcta cctttgacct ctgggaggaa gtctacggct
651 catcgttttt taccacggcc gtgcagcatc gtgccctagt cgaagggtcg
701 gctttcgcca aaaagcttgg ccaactctgt cccgactgtc tctcccaggc
751 atcgcagatc ctctgctttt tgcagtcgta ctggaccggt gcttacgtgc
801 tctctaactt tgggtggtggc cgctcagggg aggacgcaa ctcgatcctc
851 ggagttctgc atactttcga ccccgatgca gactgcgatg ataccacttt
901 ccagccttgt tctgcccggg cgcttgcgaa ccataaagta gttacggact
1001 ctttccggtc catctactct ctcaactcgg gtattgcca gggtaagcc
1051 gtggctgtgg gacggtatcc cgaggacgtc taccaggag gcaatccatg
1101 gtatctctgt actttggctg cggcggagca gctctacgac gcgctgtatc
1151 aatgggatcg aatcgggtcc ttgtctataa cggacgtcag tctgggattc
1201 ttccaggacc tgtaccgctc cgctgcagta ggtgactatg cgtcttccac
1251 ggagacatac agagatatca tggcagctgt gaaggcctat gcgaatggat
1301 atatggatat tgctagaaaag tacacacctg ccaacggcgc tctagcagag
1351 cagttttcta gagacgatgg ttccccagtc tcagcggctc atctgacctg
1401 gtcgtatgcc tctcttctca cggcagcagc cagacgaggc tcccagatgc
1451 cgccatcgtg gaacgaatct tcttccaaca agcctccatc gacttgctca
1501 gcatcctctg cgacgggggc ctatgcctcg gctaccaaca ccgtctggcc
1551 cacagcgtcg tgtgcggcga cgccgacagc cgtgcctgtg cgtttcaacg
1601 aactggtcac gacttcagtc ggggataagg tagccctcgt ggggtccacc
1651 cctgctctgg ggtcatggaa tgtctttgcg gccgtcgcac tgagtgcaga
1701 cgaatacagc agcgtcacgc ccctatggca cgggacggtg agtctcccga
1751 ccaaaacgag cttcgagtat aagtatgtgg tgcagaagga gtctggggaa
1801 gtggactggg agggcggaga gaatcggtcg tacacagtcg cagagggatg
1851 cgagggcttt tcagtgaccg tcaacgacag ctggaagtag

```

(SEC ID NÚM:3)

**5 Secuencia de aminoácidos de MkGA II (la proteína madura)**

```

1 ASDSLDSWLA RETPYALDGI LNNIGPDGAK AVGAVSGVVV ASPSKSNPDY
51 FYTWTRDAAL TVKCLTDLFL VNGDVNLQSQ IQNYISRQAY LQTVSNPSGD
101 LSTGGLGEPK FEVDGAAFTG SWGRPQRDGP ALRATALIAY ANWLI SNGQT
151 STAESIVWPV VQNDLSYVMQ YWNSSTFDLW EEVYGSSFFT TAVQHRALVE
201 GAAFAKKLGH SCPDCLSQAS QILCFLQSYW TGAYVLSNFG GGRSGKDANS
251 ILGLVHTFDP DADDDTTFQ PCSARALANH KVVTDSEFRSI YSLNSGIAQG
301 QAVAVGRYPE DVYQGGNPWY LCTLAAAEQL YDALYQWDRI GSL SITDVSL
351 GFFQDLYPSA AVGDYASSTE TYRDIMAAVK AYANGYMDIA RKYTPANGAL
401 AEQFSRDDGS PVSVDLTWS YASLLTAAAR RGSQMPPSWN ESSSNKPPST
451 CSASSATGAY ASATNTVWPT ASCAATPTAV PVRFNELVTT SVGDKVALVG
501 STPALGSWNV SAAVALSADE YSSVTPLWHG TVSLPTKTSF EYKYVVQKES
551 GEVDWEGGEN RSYTVPEGCE GSSVTVNSW K

```

(SEC ID NÚM:4)

ADNg MkGA I

```

1 atggtgaaga tcagcataaa tcccatcttg aaacggacat tccctctatc
51 agtgctgctg ggcgcgctcc tcgcagcctg tcttggggct tcaaacctag
101 ctcagatcgc tgttgccgct gcaacatcgg cggagtcagg tgctgctct
151 gattccttag attcatggct ggccagagag actccatag cccttgatgg
201 aattttaaat aacatcggcc cagacggcgc gaaggctgtg ggtgcagtct
251 ctggcgtggt ggttgcgagt ccgagcaaga gtaatccgga ttgtgagtat
301 tctcgtattt ccagcccca acgtcaagt catctatagc aaagaaagaa
351 aaagctcatg ctaatggatg tatctgtata ttttctaca cttggactcg
401 tgacgctgct ctgactgtta aatgtctgac cgacctcttc ctggccaatg
451 gtgacgtgaa tctgcagctg cagatccaga actacatcag ccgccaggca
501 tatttgacaga ccgatccaa tccatctggt gacctgtcga ctgggggact
551 tggtagagccc aaattcgagg ttgatggcgc tgcatttacc ggttcctggg
601 gccgtcctca ccgagatggg cctgcgttga gggctacggc tctgattgct
651 tatgccaatt gcctcattgt aggtggttgc atggtggatt ttctttctt
701 tctaataata tcttctcttg ttgttacttg ctaacttcca tctacagagc
751 aatggacaga cctcgacggc ggagtccatt gtttgccag ttgtccagaa
801 tgacctttca tatgtgatgc agtattggaa ttcactacc tttggttgt
851 cgaggcctct aaaatgggac aagcattctc agctaacgta tggaaacttc
901 atgcagacct ctgggaggaa gtctacggct catcgTTTT taccacggcc
951 gtgcagcate gtgccctagt cgaagggtgc gctttcgcca aaaagcttg
1001 ccaactcttg cccgactgtc tctcccaggc atcgagatc ctctgctttt
1051 tgcagtcgta ctggaccggg gcttacgtgc tctctaactt tgggtggtggc
1101 cgctcagggg aggacgccaa ctogatcctc ggagttctgc atactttcga
1151 ccccgatgca gactgcgatg ataccacttt ccagccttgt tctgcccggg
1201 cgcttgcgaa ccataaagta gttacggact ctttcgggct catctactct
1251 ctcaactcgg gtattgccc gggccaagcc gtggctgtgg gacggtatcc
1301 cgaggcagtc taccagggag gcaatccatg gtatctctgt actttggctg
1351 cggcggagca gctctacgac gcgctgtatc aatgggatcg aatcgggtcc
1401 ttgtctataa cggacgtcag tctgggatte tccaggacc tgtaccgctc
1451 cgctgcagta ggtgactatg cgtcttccac ggagacatac agagatatca
1501 tggcagctgt gaaggcctat gcgaatggat atatggatat tgctgtaagg
1551 agagctcctt tccatctttt ccttgtccca tgctgaaata gtgctacaga
1601 gaaagtacac acctgccaac ggcgctctag cagagcagtt ttctagagac
1651 gatggttccc cagtctcagc ggtcgatctg acctggctgt atgcctctct
1701 tctcacggca gcagccagac gaggtcccca gatgcgcgca tctggaacg
1751 aatcttcttc caacaagcct ccatcgactt gctcagcatc ctctgcgacg
1801 gggccctatg cctcggctac caacaccgctc tggcccacag cgtcgtcacg
1851 cccctatggc acgggacggg tagtctcccg accaaaacga gcttcgagta
1901 taagtatgtg gtgcagaagg agtctgggga agtggactgg gaggcgggag
1951 agaatcggtc gtacacagtg ccagagggat gcgagggctc ttcagtgacc
2001 gtcaacgaca gctggaagta g

```

(SEC ID NÚM:5)

5 Secuencia de ADNc de MkGA I

```

1 atggtgaaga tcagcataaa tcccatcttg aaacggacat tccctctatc
51 agtgctgctg ggcgcgctcc tcgcagcctg tcttggggct tcaaacctag
101 ctcagatcgc tgttgccgct gcaacatcgg cggagtcagg tgctgctct
151 gattccttag attcatggct ggccagagag actccatag cccttgatgg
201 aattttaaat aacatcggcc cagacggcgc gaaggctgtg ggtgcagtct
251 ctggcgtggt ggttgcgagt ccgagcaaga gtaatccgga ttatttctac
301 acttgactc gtgacgctgc tctgactgtt aatgtctga ccgacctctt
351 cctggccaat ggtgacgtga atctgcagtc gcagatccag aactacatca

```

## ES 2 616 917 T3

401 gccgccaggc atatttgcag accgtatcca atccatctgg tgacctgtcg  
451 actgggggac ttggtgagcc caaattcgag gttgatggcg ctgcatttac  
501 cggttcctgg ggccgtcctc aacgagatgg gcctgcgctg agggctacgg  
551 ctctgattgc ttatgccaat tggctcatta gcaatggaca gacctcgacg  
601 gcggagtcca ttgtttggcc agttgtccag aatgaccttt catatgtgat  
651 gcagtattgg aattcatcta cttttgacct ctgggaggaa gtctacggct  
701 catcgttttt taccacggcc gtgcagcatc gtgccctagt cgaagggtcg  
751 gctttcgcca aaaagcttgg ccaactctgt cccgactgtc tctcccaggc  
801 atcgcagatc ctctgctttt tgcagtcgta ctggaccggt gcttacgtgc  
851 tctctaactt tgggtggtggc cgctcagga aggacgcaa ctcgatcctc  
901 ggagttctgc atactttcga ccccgatgca gactgcgatg ataccacttt  
951 ccagccttgt tctgcccggg cgcttgcgaa ccataaagta gttacggact  
1001 ctttcocggc catctactct ctcaactcgg gtattgcca gggcaagcc  
1051 gtggctgtgg gacggtatcc cgaggacgtc taccagggag gcaatccatg  
1101 gtatctctgt actttggctg cggcggagca gctctacgac gcgctgtatc  
1151 aatgggatcg aatcgggtcc ttgtctataa cggacgtcag tctgggattc  
1201 ttccaggacc tgtaccocgtc cgctgcagta ggtgactatg cgtcttccac  
1251 ggagacatac agagatatca tggcagctgt gaaggcctat gcgaatggat  
1301 atatggatat tgctagaaag tacacacctg ccaacggcgc tctagcagag  
1351 cagttttcta gagacgatgg ttccccagtc tcagcggctg atctgacctg  
1401 gtcgatgccc tctcttctca cggcagcagc cagacgaggc tcccagatgc  
1451 cgccatcgty gaacgaatct tcttccaaca agcctccatc gacttgctca  
1501 gcatectctg cgacggggcc ctatgcctcg gctaccaaca ccgtctggcc  
1551 cacagcgtcg tcacgccccct atggcacggg acggtga

### (SEC ID NÚM:6)

#### Secuencia de aminoácidos de Mk GA I (la proteína madura)

1 ASDSLDSWLA RETPYALDGI LNNIGPDGAK AVGAVSGVVV ASPSKSNPDY  
51 FYTWTRDAAL TVKCLTDLFL VNGDVNLQSQ IQNYISRQAY LQTVSNPSGD  
101 LSTGGLGEPK FEVDGAAFTG SWGRPQRDGP ALRATALIAY ANWLI SNGQT  
151 STAESIVWPV VQNDLSYVMQ YWNSSTFDLW EEVYGSSFFT TAVQHRALVE  
201 GAAFAKKLGH SCPDCLSQAS QILCFLQSYW TGAYVLSNFG GGRSGKDANS  
251 ILGVLHTFDP DADCDDTTFQ PCSARALANH KVVTDSEFRSI YSLNSGIAQG  
301 QAVAVGRYPE DVYQGGNPWY LCTLAAAEQL YDALYQWDRI GSL SITDVSL  
351 GFFQDLYPSA AVGDYASSTE TYRDIMAAVK AYANGYMDIA RKYTPANGAL  
401 AEQFSRDDGS PVS AVDLTWS YASLLTAAAR RGSQMPPSWN ESSSNKPPST  
451 CSASSATGPY ASATNTVWPT ASSRPYGTGR

### 5 (SEC ID NÚM:7)

#### Cebador Deg.FW

GAYTAYTTYTAYACNTGG

### (SEC ID NÚM:8)

#### Cebador Deg.RV

10 YTGR TANACRTCDTCNGG

### (SEC ID NÚM:9)

#### Sonda de Mk GA FW

CTGGTCAATGGTGACGTGAATC

### (SEC ID NÚM:10)

15 Sonda de Mk GA RV

GCAATACCCGAGTTGAGAGAGTAG

(SEC ID NÚM:11)

**Cebador MkGA FW**

ATGATTGACACAAAACCGACTGATATCGTCTC

(SEC ID NÚM:12)

5 **Cebador MkGA RV**

CTACTTCCAGCTGTCGTTGACGGTCAC

(SEC ID NÚM:13)

**Cebador MkGA FW – expresión Tr**

5' GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCACCATGGTGAAGATCAGCATAAATCCCATC 3',

10 (SEC ID NÚM:14)

**Cebador MkGA II RV – expresión Tr**

5' ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTACTTCCAGCTGTCGTTGACGGTC 3'

(SEC ID NÚM:15)

**Cebador MkGA I RV – expresión Tr**

15 5' ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCACCGTCCCGTGCCATAGGGGCGTG 3'

(SEC ID NÚM:16)

**Cebador MkGA I +ATG FW – expresión Tr**

5' GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGATTGACACAAAACCGACTGATATCGTCTC 3'

(SEC ID NÚM:17)

20 **ADNg MkGA I +ATG**

# ES 2 616 917 T3

```

1 atgattgaca caaaaccgac tgatatcgtc tcgaaaatgg tgaagatcag
51 cataaatccc atcttgaaac ggacattccc tctatcagtg ctgctggcgc
101 cgctcctcgc agcctgtctt ggggcttcaa acctagctca gatcgctggt
151 gccgctgcaa catcggcgga gtcaagtgtc gcgtctgatt ccttagattc
201 atggctggcc agagagactc catatgccct tgatggaatt ttaaataaca
251 tcggcccaga cggcgcgaag gctgtgggtg cagtctctgg cgtggtggtt
301 gcgagtccga gcaagagtaa tccggattgt gagtattctc gtatttccag
351 cccccaacgt caagtgcata tatagcaaag aaagaaaaag ctcatgctaa
401 tggatgtatc tgtatatatt tctacacttg gactcgtgac gctgctctga
451 ctgttaaatag tctgaccgac ctcttctctg tcaatgggta cgtgaatctg
501 cagtcgcaga ctcagaacta catcagccgc caggcatatt tgacagccgt
551 atccaatcca tctggtgacc tgtcgcactg gggacttggg gagcccaaat
601 tcgaggttga tggcgtgca tttaccggtt cctggggccg tcctcaacga
651 gatgggcctg cgttgagggc tacggctctg attgcttatg ccaattggct
701 cattgtagggt gtttgcatgt tggattttct tttctttcta atataatctt
751 ctcttgttgt tacttgctaa cttccatcta cagagcaatg gacagacctc
801 gacggcggag tccattgttt ggccagttgt ccagaatgac ctttcatatg
851 tgatgcagta ttggaattca tctacctttg gtttgcgag gcctctaaaa
901 tgggacaagc attctcagct aacgatgga aacttcatgc agacctctgg
951 gaggaagtct acggctcacc gttttttacc acggcctgac agcatcgtgc
1001 cctagtgcga ggtgcggctt tcgccaaaaa gcttggccac tcttgtcccg
1051 actgtctctc ccaggcatcg cagatcctct gctttttgca gtcgtaactg
1101 accggtgctt acgtgctctc taactttggg ggtggccgct caggggaagga
1151 cgccaactcg atcctcggag ttctgcatac tttcgacccc gatgcagact
1201 gcgatgatac cactttccag ccttgttctg cccgggcgct tgcaaccat
1251 aaagtagtta cggactcttt ccggtccatc tactctctca actcgggtat
1301 tgcccagggg caagccgtgg ctgtgggacg gtatcccagag gacgtctacc
1351 agggaggcaa tccatgggat ctctgtactt tggctgcggc ggagcagctc
1401 tacgacgcgc tgtatcaatg ggatcgaatc gggtccttgt ctataacgga
1451 cgtcagctctg ggattcttcc aggacctgta cccgtccgct gcagtagggtg
1501 actatgcgct tccacggag acatacagag atatcatggc agctgtgaag
1551 gcctatgcga atggatatat ggatattgct gtaaggagag ctcctttcca
1601 tcttttcctt gtcccattgt gaaatagtgc tacagagaaa gtacacacct
1651 gccaacggcg ctctagcaga gcagttttct agagacgatg gttccccagt
1701 ctacagcggc gatctgacct ggtcgtatgc ctctcttctc acggcagcag
1751 ccagacgagg ctcccagatg ccgccatcgt ggaacgaatc ttcttccaac
1801 aagcctccat cgacttgctc agcatcctct gcgacggggc cctatgcctc
1851 ggctaccaac accgtctggc ccacagcgtc gtcacgccc tatggcacgg
1901 gacggtgagt ctcccacca aaacgagctt cgagtataag tatgtggtgc
1951 agaaggagtc tggggaagtg gactgggagg gcggagagaa tcggtcgtac
2001 acagtgccag agggatgcga gggctcttca gtgaccgtca acgacagctg
2051 gaagtag

```

**Listado de secuencias**

<110> DuPont Nutrition Biosciences ApS  
 <120> Polipéptidos que tienen actividad de glucoamilasa y método para producirlos  
 <130> NB0922WOPCT  
 5 <160> 17  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 2175  
 <212> ADN  
 10 <213> Monascus kaoliang  
 <400> 1

```

atggtgaaga tcagcataaa tcccatcttg aaacggacat tccctctatc agtgctgctg      60
gcgccgctcc tcgcagcctg tcttggggct tcaaacctag ctcagatcgc tgttgccgct      120
gcaacatcgg cggagtcaag tgctgctct gattccttag attcatggct ggccagagag      180
actccatatg cccttgatgg aattttaaat aacatcggcc cagacggcgc gaaggctgtg      240
ggtgcagtct ctggcgtggt ggttgcgagt ccgagcaaga gtaatccgga ttgtgagtat      300
tctcgtatth ccagccccc aagtcgaagt catctatagc aaagaaagaa aaagctcatg      360
ctaattggatg tatctgtata tattttctaca cttggactcg tgacgctgct ctgactgtta      420
aatgtctgac cgacctcttc ctgggtcaatg gtgacgtgaa tctgcagtcg cagatccaga      480
actacatcag ccgccaggca tatttgcaga ccgatccaa tccatctggt gacctgtcga      540
ctgggggact tggtgagccc aaattcgagg ttgatggcgc tgcatttacc ggttcctggg      600
gccgtcctca acgagatggg cctgcggtga gggctacggc tctgattgct tatgcccaatt      660
ggctcattgt aggtgtttgc atgttggatt ttcttttctt tctaataataa tcttctcttg      720
ttgttacttg ctaacttcca tctacagagc aatggacaga cctcgacggc ggagtccatt      780
gtttggccag ttgtccagaa tgacctttca tatgtgatgc agtattggaa ttcacttacc      840
tttggtttgt cgaggcctct aaaatgggac aagcattctc agctaacgta tggaaacttc      900
atgcagacct ctgggaggaa gtctacggct catcgthttt taccacggcc gtgcagcatc      960
gtgccctagt cgaaggtgcg gctttcgcca aaaagcttgg cactcttgt cccgactgtc     1020
tctcccaggc atcgcagatc ctctgctttt tgcagtcgta ctggaccggt gcttacgtgc     1080
tctctaactt tgggtggtggc cgctcagggg aggacgccaa ctcgatcctc ggagttctgc     1140
atactttcga ccccgatgca gactgcgatg ataccacttt ccagccttgt tctgcccggg     1200
cgcttgcgaa ccataaagta gttacggact ctttccggtc catctactct ctcaactcgg     1260
gtattgccc a ggggtcaagcc gtggctgtgg gacggtatcc cgaggacgtc taccagggag     1320
    
```

ES 2 616 917 T3

gcaatccatg gtatctctgt actttggctg cggcggagca gctctacgac gcgctgtatc 1380  
aatgggatcg aatcgggtcc ttgtctataa cggacgtcag tctgggattc ttccaggacc 1440  
tgtaccogtc cgctgcagta ggtgactatg cgtcttccac ggagacatac agagatatca 1500  
tggcagctgt gaaggcctat gcgaatggat atatggatat tgctgtaagg agagctcctt 1560  
tccatctttt ccttgtccca tgctgaaata gtgctacaga gaaagtacac acctgccaac 1620  
ggcgctctag cagagcagtt ttctagagac gatggttccc cagtctcagc ggtcgatctg 1680  
acctggtcgt atgcctctct tctcacggca gcagccagac gaggctccca gatgccgcca 1740  
tcgtggaacg aatcttcttc caacaagcct ccatcgactt gctcagcatc ctctgcgacg 1800  
ggggcctatg cctcggctac caacaccgtc tggcccacag cgtcgtgtgc ggcgacgccg 1860  
acagccgtgc ctgtgcgttt caacgaactg gtcacgactt cagtcgggga taaggtagcc 1920  
ctcgtgggggt ccaccctctgc tctgggggtca tggaatgtct ctgcggccgt cgcactgagt 1980  
gcagacgaat acagcagcgt cacgcccta tggcacggga cggtgagtct cccgaccaaa 2040  
acgagcttcg agtataagta tgtggtgcag aaggagtctg gggaagtgga ctgggagggc 2100  
ggagagaatc ggtcgtacac agtgccagag ggatgcgagg gctcttcagt gaccgtcaac 2160  
gacagctgga agtag 2175

<210> 2  
<211> 1890  
<212> ADN  
<213> Monascus kaoliang

5

<400> 2  
atggtgaaga tcagcataaa tcccatcttg aaacggacat tccctctatc agtgctgctg 60  
gcgccgctcc tcgcagcctg tcttggggct tcaaacctag ctcagatcgc tgttgccgct 120  
gcaacatcgg cggagtcaag tgctgcgtct gattccttag attcatggct ggccagagag 180  
actccatatg cccttgatgg aattttaaat aacatcggcc cagacggcgc gaaggctgtg 240  
ggtgcagctc ctggcgtggt ggttgcgagt ccgagcaaga gtaatccgga ttatttctac 300  
acttgactc gtgacgctgc tctgactgtt aaatgtctga ccgacctctt cctggtcaat 360  
ggtgacgtga atctgcagtc gcagatccag aactacatca gccgccaggc atatttgag 420  
accgtatcca atccatctgg tgacctgtcg actgggggac ttggtgagcc caaattcgag 480  
gttgatggcg ctgcatttac cggttcctgg ggccgtcctc aacgagatgg gcctgcgttg 540  
agggctacgg ctctgattgc ttatgccaat tggctcatta gcaatggaca gacctcgacg 600  
gcggagtcca ttgtttggcc agttgtccag aatgaccttt catatgtgat gcagtattgg 660  
aattcatcta cctttgacct ctgggaggaa gtctacggct catcgttttt taccacggcc 720  
gtgcagcatc gtgccctagt cgaaggtgcg gctttcgcca aaaagcttgg ccactcttgt 780

ES 2 616 917 T3

cccgactgtc tctcccaggc atcgcagatc ctctgctttt tgcagtcgta ctggaccggt 840  
 gcttacgtgc tctctaactt tgggtggtggc cgctcagggg aggacgcaa ctcgatcctc 900  
 ggagttctgc atactttcga ccccgatgca gactgcatg ataccacttt ccagccttgt 960  
 tctgcccggg cgcttgcgaa ccataaagta gttacggact ctttccggtc catctactct 1020  
 ctcaactcgg gtattgccca gggtaagcc gtggctgtgg gacggtatcc cgaggacgtc 1080  
 taccagggag gcaatccatg gtatctctgt actttggctg cggcggagca gctctacgac 1140  
 gcgctgtatc aatgggatcg aatcgggtcc ttgtctataa cggacgtcag tctgggatc 1200  
 ttccaggacc tgtaccctgc cgctgcagta ggtgactatg cgtcttccac ggagacatac 1260  
 agagatatca tggcagctgt gaaggcctat gcgaatgat atatggatat tgctagaaag 1320  
 tacacacctg ccaacggcgc tctagcagag cagttttcta gagacgatgg ttcccagtc 1380  
 tcagcggtcg atctgacctg gtcgtatgcc tctcttctca cggcagcagc cagacgaggc 1440  
 tcccagatgc cgccatcgtg gaacgaatct tcttccaaca agcctccatc gacttgctca 1500  
 gcacacctcg cgacgggggc ctatgcctcg gctaccaaca ccgtctggcc cacagcgtcg 1560  
 tgtcggcga cgccgacagc cgtgcctgtg cgtttcaacg aactggtcac gacttcagtc 1620  
 ggggataagg tagccctcgt ggggtccacc cctgctctgg ggatcatgaa tgtctttgcg 1680  
 gccgtcgcac tgagtgcaga cgaatacagc agcgtcacgc ccctatggca cgggacggtg 1740  
 agtctcccga ccaaacgag cttcgagtat aagtatgtgg tgcagaagga gtctggggaa 1800  
 gtggactggg agggcggaga gaatcggtcg tacacagtgc cagagggatg cgagggcttt 1860  
 tcagtgaccg tcaacgacag ctggaagtag 1890

<210> 3

<211> 581

<212> PRT

5 <213> Monascus kaoliang

<400> 3

Ala Ser Asp Ser Leu Asp Ser Trp Leu Ala Arg Glu Thr Pro Tyr Ala  
 1 5 10 15

Leu Asp Gly Ile Leu Asn Asn Ile Gly Pro Asp Gly Ala Lys Ala Val  
 20 25 30

Gly Ala Val Ser Gly Val Val Val Ala Ser Pro Ser Lys Ser Asn Pro  
 35 40 45

Asp Tyr Phe Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ala Ala Leu Thr Val Lys Cys  
 50 55 60

Leu Thr Asp Leu Phe Leu Val Asn Gly Asp Val Asn Leu Gln Ser Gln



ES 2 616 917 T3

Leu Cys Thr Leu Ala Ala Ala Glu Gln Leu Tyr Asp Ala Leu Tyr Gln  
 325 330 335  
 Trp Asp Arg Ile Gly Ser Leu Ser Ile Thr Asp Val Ser Leu Gly Phe  
 340 345 350  
 Phe Gln Asp Leu Tyr Pro Ser Ala Ala Val Gly Asp Tyr Ala Ser Ser  
 355 360 365  
 Thr Glu Thr Tyr Arg Asp Ile Met Ala Ala Val Lys Ala Tyr Ala Asn  
 370 375 380  
 Gly Tyr Met Asp Ile Ala Arg Lys Tyr Thr Pro Ala Asn Gly Ala Leu  
 385 390 395 400  
 Ala Glu Gln Phe Ser Arg Asp Asp Gly Ser Pro Val Ser Ala Val Asp  
 405 410 415  
 Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ser Leu Leu Thr Ala Ala Ala Arg Arg Gly  
 420 425 430  
 Ser Gln Met Pro Pro Ser Trp Asn Glu Ser Ser Ser Asn Lys Pro Pro  
 435 440 445  
 Ser Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ala Thr Gly Ala Tyr Ala Ser Ala Thr  
 450 455 460  
 Asn Thr Val Trp Pro Thr Ala Ser Cys Ala Ala Thr Pro Thr Ala Val  
 465 470 475 480  
 Pro Val Arg Phe Asn Glu Leu Val Thr Thr Ser Val Gly Asp Lys Val  
 485 490 495  
 Ala Leu Val Gly Ser Thr Pro Ala Leu Gly Ser Trp Asn Val Ser Ala  
 500 505 510  
 Ala Val Ala Leu Ser Ala Asp Glu Tyr Ser Ser Val Thr Pro Leu Trp  
 515 520 525  
 His Gly Thr Val Ser Leu Pro Thr Lys Thr Ser Phe Glu Tyr Lys Tyr  
 530 535 540  
 Val Val Gln Lys Glu Ser Gly Glu Val Asp Trp Glu Gly Gly Glu Asn  
 545 550 555 560  
 Arg Ser Tyr Thr Val Pro Glu Gly Cys Glu Gly Ser Ser Val Thr Val  
 565 570 575

ES 2 616 917 T3

Asn Asp Ser Trp Lys  
580

<210> 4  
<211> 2021  
<212> ADN  
5 <213> Monascus kaoliang

<400> 4

atggtgaaga	tcagcataaa	tcccatcttg	aaacggacat	tccctctatc	agtgctgctg	60
gcgccgctcc	tcgcagcctg	tcttggggct	tcaaacctag	ctcagatcgc	tgttgccgct	120
gcaacatcgg	cggagtcaag	tgctgctct	gattccttag	attcatggct	ggccagagag	180
actccatatg	cccttgatgg	aattttaaat	aacatcggcc	cagacggcgc	gaaggctgtg	240
ggtgcagtct	ctggcgtggt	ggttgcgagt	ccgagcaaga	gtaatccgga	ttgtgagtat	300
tctcgtatct	ccagccccc	acgtcaagtg	catctatagc	aaagaaagaa	aaagctcatg	360
ctaatggatg	tatctgtata	tatttctaca	cttggactcg	tgacgctgct	ctgactgtta	420
aatgtctgac	cgacctcttc	ctggtcaatg	gtgacgtgaa	tctgcagtcg	cagatccaga	480
actacatcag	ccgccaggca	tatttgcaga	ccgtatccaa	tccatctggt	gacctgtcga	540
ctgggggact	tggtgagccc	aaattcgagg	ttgatggcgc	tgcatctacc	ggttcctggg	600
gccgtcctca	acgagatggg	cctgcgttga	gggctacggc	tctgattgct	tatgccaaatt	660
ggctcattgt	aggtgtttgc	atggtggatt	ttcttttctt	tctaataata	tcttctcttg	720
ttgttacttg	ctaacttcca	tctacagagc	aatggacaga	cctcgacggc	ggagtccatt	780
gtttggccag	ttgtccagaa	tgacctttca	tatgtgatgc	agtattggaa	ttcatctacc	840
tttggtttgt	cgaggcctct	aaaatgggac	aagcattctc	agctaacgta	tggaaacttc	900
atgcagacct	ctgggaggaa	gtctacggct	catcgttttt	taccacggcc	gtgcagcatc	960
gtgccctagt	cgaaggtgcg	gctttcgcca	aaaagcttgg	ccactcttgt	cccgactgtc	1020
tctcccaggc	atcgcagatc	ctctgctttt	tgcagtcgta	ctggaccggg	gcttacgtgc	1080
tctctaactt	tggtggtggc	cgctcaggga	aggacgcca	ctcgatcctc	ggagttctgc	1140
atactttcga	ccccgatgca	gactgcatg	ataccacttt	ccagccttgt	tctgcccggg	1200
cgcttgcgaa	ccataaagta	gttacggact	ctttccggtc	catctactct	ctcaactcgg	1260
gtattgocca	gggtcaagcc	gtggctgtgg	gacggtatcc	cgaggacgtc	taccagggag	1320
gcaatccatg	gtatctctgt	actttggctg	cggcggagca	gctctacgac	gcgctgtatc	1380
aatgggatcg	aatcgggtcc	ttgtctataa	cggacgtcag	tctgggattc	ttccaggacc	1440
tgtaccocgtc	cgctgcagta	ggtgactatg	cgtcttccac	ggagacatac	agagatatca	1500
tggcagctgt	gaaggcctat	gcgaatgat	atatggatat	tgctgtaagg	agagctcctt	1560

ES 2 616 917 T3

tccatctttt ccttgtccca tgctgaaata gtgctacaga gaaagtacac acctgccaac 1620  
 ggcgctctag cagagcagtt ttctagagac gatggttccc cagtctcagc ggtcgatctg 1680  
 acctggtcgt atgcctctct tctcacggca gcagccagac gaggctccca gatgccgcca 1740  
 tcgtggaacg aatcttcttc caacaagcct ccatcgactt gctcagcatc ctctgcgacg 1800  
 gggccctatg cctcggctac caacaccgtc tggcccacag cgtcgtcacg cccctatggc 1860  
 acgggacggt gagtctcccg accaaaacga gcttcgagta taagtatgtg gtgcagaagg 1920  
 agtctgggga agtggactgg gagggcggag agaatcggtc gtacacagtg ccagagggat 1980  
 gcgagggctc ttcagtgacc gtcaacgaca gctggaagta g 2021

<210> 5  
 <211> 1587  
 <212> ADN  
 <213> Monascus kaoliang

5

<400> 5

atggtgaaga tcagcataaa tcccatcttg aaacggacat tccctctatc agtgctgctg 60  
 gcgccgctcc tcgcagcctg tcttggggct tcaaacctag ctcagatcgc tgttgccgct 120  
 gcaacatcgg cggagtcaag tgctgcgtct gattccttag attcatggct ggccagagag 180  
 actccatatg cccttgatgg aattttaaat aacatcggcc cagacggcgc gaaggctgtg 240  
 ggtgcagtct ctggcgtggg ggttgcgagt ccgagcaaga gtaatccgga ttatttctac 300  
 acttgactc gtgacgctgc tctgactggt aatgtctga ccgacctctt cctggccaat 360  
 ggtgacgtga atctgcagtc gcagatccag aactacatca gccgccaggc atatttgag 420  
 accgtatcca atccatctgg tgacctgctg actgggggac ttggtgagcc caaattcgag 480  
 gttgatggcg ctgcatttac cggttcctgg ggccgtcctc aacgagatgg gcctgcgctg 540  
 agggctacgg ctctgattgc ttatgccaat tggctcatta gcaatggaca gacctgacg 600  
 gcggagtcca ttgtttggcc agttgtccag aatgacctt catatgtgat gcagtattgg 660  
 aattcatcta cctttgacct ctgggaggaa gtctacggct catcgtttt taccacggcc 720  
 gtgcagcatc gtgccctagt cgaaggctgc gctttcgcca aaaagcttgg ccaactcttgt 780  
 cccgactgtc tctcccaggc atcgagatc ctctgctttt tgcagtcgta ctggaccggt 840  
 gcttacgtgc tctctaactt tgggtggtggc cgctcagga aggacgcaa ctcgatcctc 900  
 ggagttctgc atactttcga ccccgatgca gactgcgatg ataccacttt ccagccttgt 960  
 tctgcccggg cgcttgcgaa ccataaagta gttacggact ctttccggtc catctactct 1020  
 ctcaactcgg gtattgccca gggtaagcc gtggctgtgg gacggtatcc cgaggacgtc 1080  
 taccagggag gcaatccatg gtatctctgt actttggctg cggcggagca gctctacgac 1140  
 gcgctgtatc aatgggatcg aatcgggtcc ttgtctataa cggacgtcag tctgggattc 1200

ES 2 616 917 T3

ttccaggacc tgtaccgctc cgctgcagta ggtgactatg cgtcttccac ggagacatac 1260  
 agagatatca tggcagctgt gaaggcctat gcgaatggat atatggatat tgctagaaag 1320  
 tacacacctg ccaacggcgc tctagcagag cagttttcta gagacgatgg ttccccagtc 1380  
 tcagcggctg atctgacctg gtcgtatgcc tctcttctca cggcagcagc cagacgaggc 1440  
 tcccagatgc cgccatcgtg gaacgaatct tcttccaaca agcctccatc gacttgctca 1500  
 gcatacctctg cgacggggcc ctatgcctcg gctaccaaca ccgctctggcc cacagcgtcg 1560  
 tcacgcccct atggcacggg acggtga 1587

<210> 6

<211> 480

<212> PRT

5 <213> Monascus kaoliang

<400> 6

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



ES 2 616 917 T3

Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ser Leu Leu Thr Ala Ala Ala Arg Arg Gly  
 420 425 430

Ser Gln Met Pro Pro Ser Trp Asn Glu Ser Ser Ser Asn Lys Pro Pro  
 435 440 445

Ser Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ala Thr Gly Pro Tyr Ala Ser Ala Thr  
 450 455 460

Asn Thr Val Trp Pro Thr Ala Ser Ser Arg Pro Tyr Gly Thr Gly Arg  
 465 470 475 480

<210> 7

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Monascus kaoliang

<400> 7

Gly Ala Tyr Thr Ala Tyr Thr Thr Tyr Thr Ala Tyr Ala Cys Asn Thr  
 1 5 10 15

Gly Gly

<210> 8

<211> 18

10 <212> PRT

<213> Monascus kaoliang

<400> 8

Tyr Thr Gly Arg Thr Ala Asn Ala Cys Arg Thr Cys Asp Thr Cys Asn  
 1 5 10 15

Gly Gly

<210> 9

15 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador ADN

20 <400> 9

ctggtaatg gtagcgtgaa tc 22

<210> 10

<211> 24

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador ADN

<400> 10

gcaatacccg agttgagaga gtag 24

30 <210> 11

<211> 32

<212> ADN

# ES 2 616 917 T3

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador ADN  
 <400> 11  
 5 atgattgaca caaaaccgac tgatatcgtc tc 32  
 <210> 12  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Cebador ADN  
 <400> 12  
 ctactccag ctgtcgttga cggtcac 27  
 <210> 13  
 15 <211> 59  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador ADN  
 20 <400> 13  
 gggacaagtt tgtacaaaaa agcaggctca ccatggtgaa gatcagcata aatcccatc 59  
 <210> 14  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador ADN  
 <400> 14  
 accactttgt acaagaaagc tgggtctact tccagctgtc gttgacggtc 50  
 30 <210> 15  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <223> Cebador ADN  
 <400> 15  
 accactttgt acaagaaagc tgggttcacc gtcccgtgcc ataggggcgt g 51  
 <210> 16  
 <211> 60  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador ADN  
 <400> 16  
 45 gggacaagtt tgtacaaaaa agcaggctat gattgacaca aaaccgactg atatcgtctc 60  
 <210> 17  
 <211> 2057  
 <212> ADN  
 <213> Monascus kaoliang  
 50 <400> 17

ES 2 616 917 T3

atgattgaca	caaaaccgac	tgatatcgtc	tcgaaaatgg	tgaagatcag	cataaatccc	60
atcttgaaac	ggacattccc	tctatcagtg	ctgctggcgc	cgctcctcgc	agcctgtctt	120
ggggcttcaa	acctagctca	gatcgctggt	gccgctgcaa	catcggcgga	gtcaagtgct	180
gogtctgatt	ccttagattc	atggctggcc	agagagactc	catatgccct	tgatggaatt	240
ttaaataaca	tcggcccaga	cggcgcggaag	gctgtgggtg	cagtctctgg	cgtggtggtt	300
gogagtccga	gcaagagtaa	tccggattgt	gagtattctc	gtatttccag	cccccaacgt	360
caagtgcac	tatagcaaag	aaagaaaaag	ctcatgctaa	tggatgtatc	tgtatatatt	420
tctacacttg	gactcgtgac	gctgctctga	ctgttaaagt	tctgaccgac	ctcttctctg	480
tcaatggtga	cgtgaatctg	cagtcgcaga	tccagaacta	catcagccgc	caggcatatt	540
tgcagaccgt	atccaatcca	tctggtgacc	tgtcgactgg	gggacttggg	gagcccaaat	600
tcgaggttga	tggcgctgca	tttaccgggt	cctggggccg	tcctcaacga	gatgggcctg	660
cgttgagggc	tacggctctg	attgcttatg	ccaattggct	cattgtaggt	gtttgcatgt	720
tggatthct	tttctttcta	atataatctt	ctcttgttgt	tacttgctaa	cttccatcta	780
cagagcaatg	gacagacctc	gacggcggag	tccattgttt	ggccagttgt	ccagaatgac	840
ctttcatatg	tgatgcagta	ttggaattca	tctacctttg	gtttgtcgag	gcctctaaaa	900
tgggacaagc	attctcagct	aacgtatgga	aacttcatgc	agacctctgg	gaggaagtct	960
acggctcatc	gttttttacc	acggccgtgc	agcatcgtgc	cctagtcgaa	ggtgcccgtt	1020
togccaaaaa	gcttggccac	tcttgtcccg	actgtctctc	ccaggcatcg	cagatcctct	1080
gctttttgca	gtcgtactgg	accggtgctt	acgtgctctc	taactttggg	ggtggccgct	1140
caggaagga	cgccaactcg	atcctcggag	ttctgcatac	tttcgacccc	gatgcagact	1200
gogatgatac	cactttccag	ccttgttctg	cccgggcgct	tgccaacat	aaagtagtta	1260

ES 2 616 917 T3

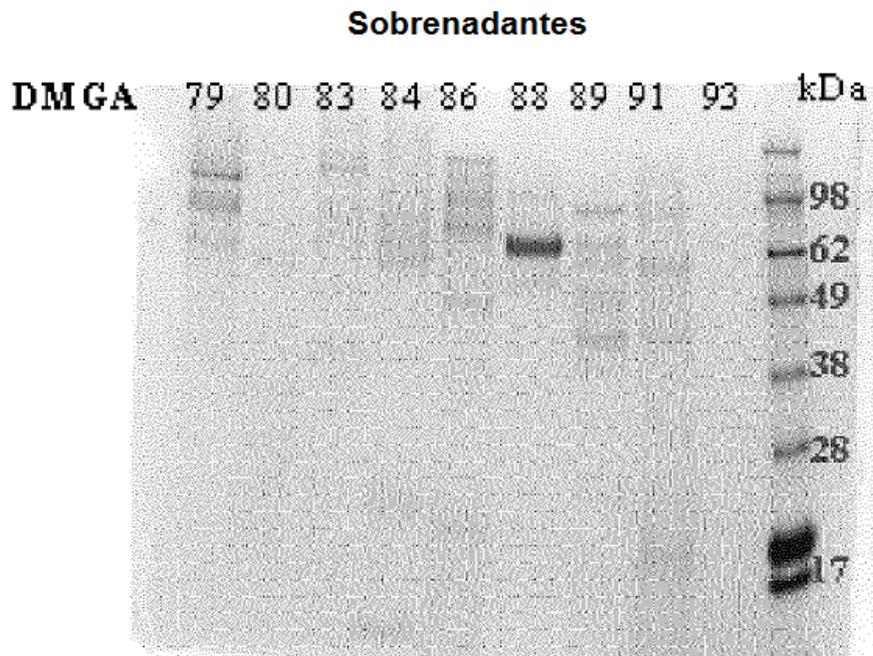
cggactcttt	ccggtccatc	tactctctca	actcgggtat	tgcccagggg	caagccgtgg	1320
ctgtgggacg	gtatcccgag	gacgtctacc	agggaggcaa	tccatgggat	ctctgtactt	1380
tggctgcggc	ggagcagctc	tacgacgcgc	tgtatcaatg	ggatcgaatc	gggtccttgt	1440
ctataacgga	cgtcagtctg	ggattcttcc	aggacctgta	cccgtccgct	gcagtaggtg	1500
actatgcgtc	ttccacggag	acatacagag	atatcatggc	agctgtgaag	gcctatgcga	1560
atggatatat	ggatattgct	gtaaggagag	ctcctttcca	tcttttcctt	gtcccatgct	1620
gaaatagtgc	tacagagaaa	gtacacacct	gccaacggcg	ctctagcaga	gcagttttct	1680
agagacgatg	gttccccagt	ctcagcggtc	gatctgacct	ggtcgtatgc	ctctcttctc	1740
acggcagcag	ccagacgagg	ctcccagatg	ccgccatcgt	ggaacgaatc	ttcttccaac	1800
aagcctccat	cgacttgctc	agcatcctct	gcgacggggc	cctatgcctc	ggctaccaac	1860
accgtctggc	ccacagcgtc	gtcacgcccc	tatggcacgg	gacggtgagt	ctcccgacca	1920
aaacgagctt	cgagtataag	tatgtggtgc	agaaggagtc	tggggaagtg	gactgggagg	1980
gcggagagaa	tcggtcgtac	acagtgccag	agggatgcga	gggctcttca	gtgaccgtca	2040
acgacagctg	gaagtag					2057

**REVINDICACIONES**

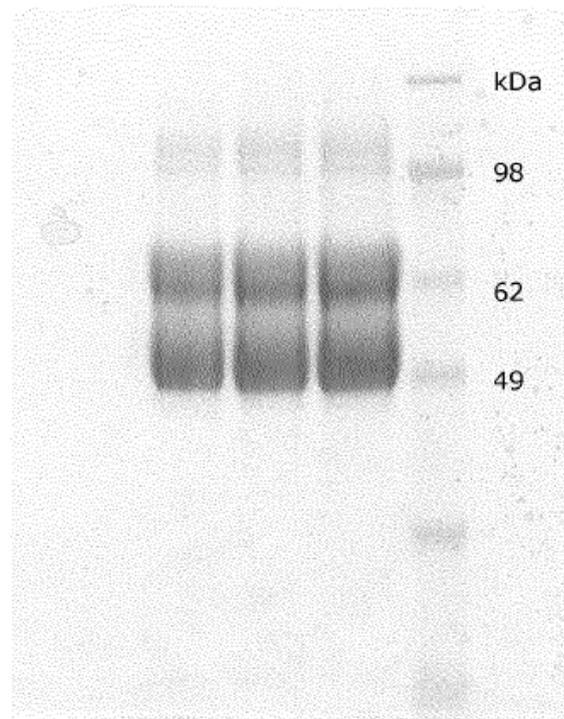
1. Un polipéptido aislado que tiene actividad de glucoamilasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el polipéptido maduro de las SEC ID NÚM: 3 y 6.
- 5 2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia de aminoácidos comprende por lo menos uno o más residuos de aminoácidos seleccionados de los siguientes grupos:
  - a) un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en A y P en una posición correspondiente a la posición 459 en la SEC ID NÚM: 3 o 6,
  - 10 b) un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en C y S en una posición correspondiente a la posición 473 en la SEC ID NÚM: 3 o 6,
  - c) un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en A y R en una posición correspondiente a la posición 474 en la SEC ID NÚM: 3 o 6,
  - d) un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en A y P en una posición correspondiente a la posición 475 en la SEC ID NÚM: 3 o 6,
  - 15 e) un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en T y Y en una posición correspondiente a la posición 476 en la SEC ID NÚM: 3 o 6,
  - f) un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en P y G en una posición correspondiente a la posición 477 en la SEC ID NÚM: 3 o 6,
  - 20 g) un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en A y G en una posición correspondiente a la posición 479 en la SEC ID NÚM: 3 o 6 y/o
  - h) un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en V y R en una posición correspondiente a la posición 480 en la SEC ID NÚM: 3 o 6.
- 25 3. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la secuencia de aminoácidos tiene por lo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NÚM: 3 o 6.
4. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEC ID NÚM:3 o 6.
5. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1- 4, en donde el polipéptido es inactivado por pasteurización, tal como usando menos de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 24, 23, 22, 21 o 20 unidades de pasteurización (PU) en cerveza.
- 30 6. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que se obtiene por expresión recombinante en una célula hospedante.
7. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
8. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, o capaz de expresar un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho vector de expresión opcionalmente comprende uno o más de:
  - a. un promotor derivado de *Trichoderma* tal como un promotor derivado de *T. reesei* cbhl;
  - b. un terminador derivado de *Trichoderma* tal como un terminador derivado de *T. reesei* cbhl;
  - c. uno o más marcadores selectivos tales como *Aspergillus nidulans* amdS y pyrG; y
  - 40 d. una o más regiones de telómeros que permiten el mantenimiento del plásmido no cromosómico en una célula hospedante.
9. Una célula hospedante que tiene expresión heteróloga de un polipéptido definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
10. Una composición que comprende uno o más polipéptidos definidos en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 45 11. La composición de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la composición se selecciona entre una composición que hidroliza almidón, una composición de sacarificación, una composición detergente, una

- composición enzimática de fermentación de alcohol y una composición para pienso animal, en donde dicha composición comprende opcionalmente una o más de otras enzimas, en donde una o más de esas otras enzimas se seleccionan entre alfa-amilasa, beta-amilasa, peptidasa (proteasa, proteinasa, endopeptidasa, exopeptidasa), pululanasa, isoamilasa, celulasa, endo-glucanasa y enzimas accesorias hidrolíticas de betaglucano relacionadas, xilanasa y enzimas accesorias de xilanasa (por ejemplo, arabinofuranosidasa, esterasa de ácido ferúlico, xilano acetil esterasa), acetolactato descarboxilasa y glucoamilasa, incluidas cualquiera de sus combinaciones.
- 5
12. Un método que comprende añadir un polipéptido definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o una composición definida en una cualquiera de las reivindicaciones 10-11 antes o durante una etapa de fermentación, tal como una etapa de fermentación con levadura.
- 10
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicha fermentación está comprendida en un procedimiento para elaborar una bebida fermentada.
14. Un método para la producción de un alimento, pienso o producto de bebida, tal como una bebida alcohólica o no alcohólica, tal como una bebida a base de cereal o malta como cerveza o whisky, tal como vino, cidra, vinagre, vino de arroz, salsa de soya o jugo, en donde dicho método comprende la etapa de tratar un material vegetal que contiene almidón y/o azúcar con un polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, o una composición definida en una cualquiera de las reivindicaciones 10-11.
- 15

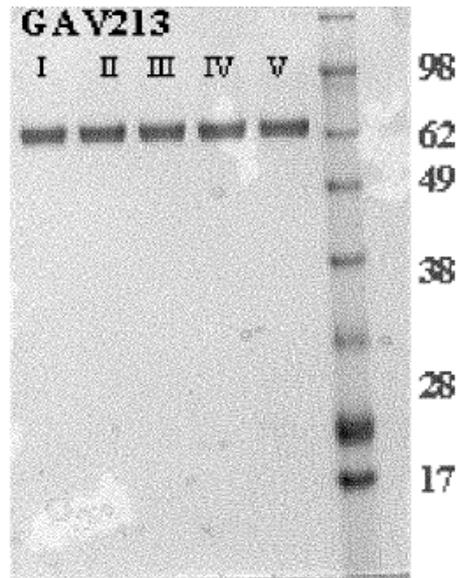
**FIGURA 1**



**FIGURA 2**



**FIGURA 3**



**FIGURA 4**

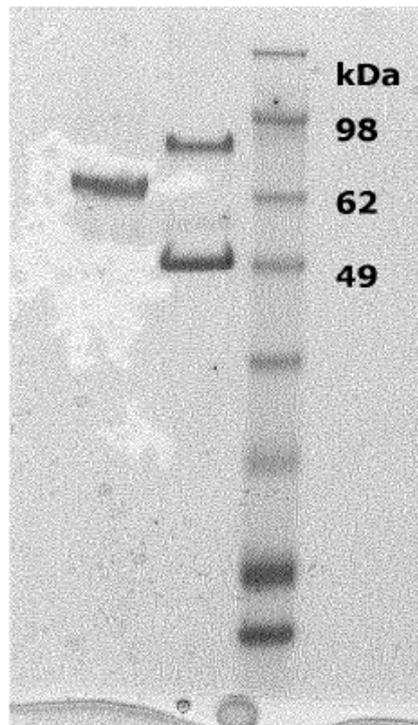


FIGURA 5

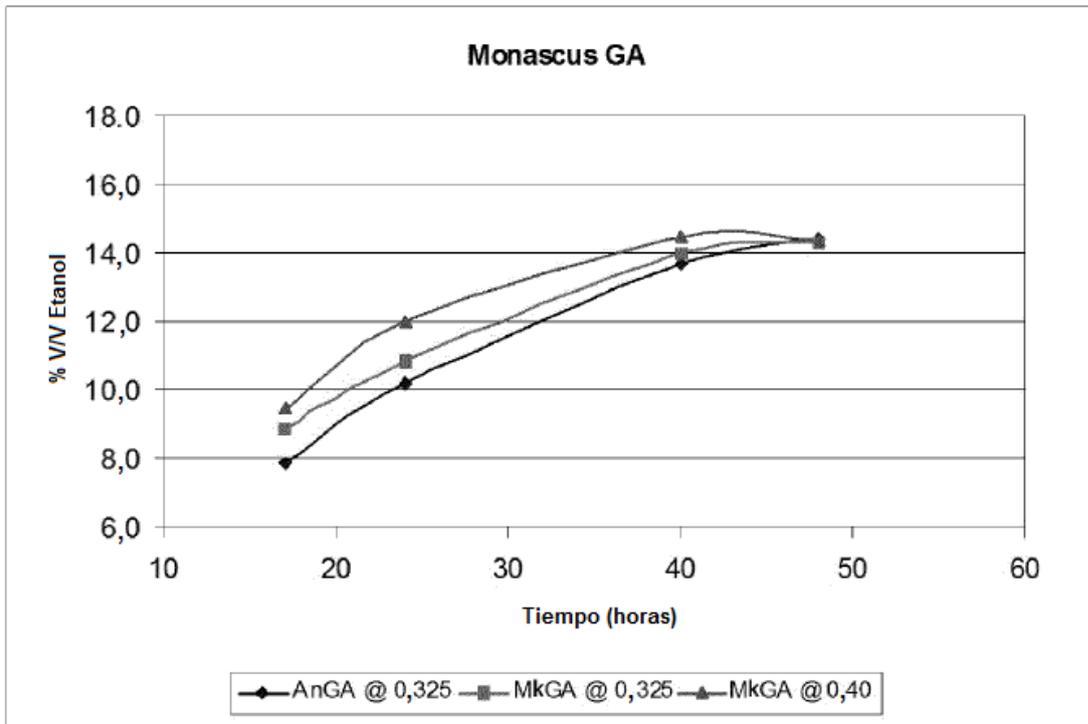


FIGURA 6

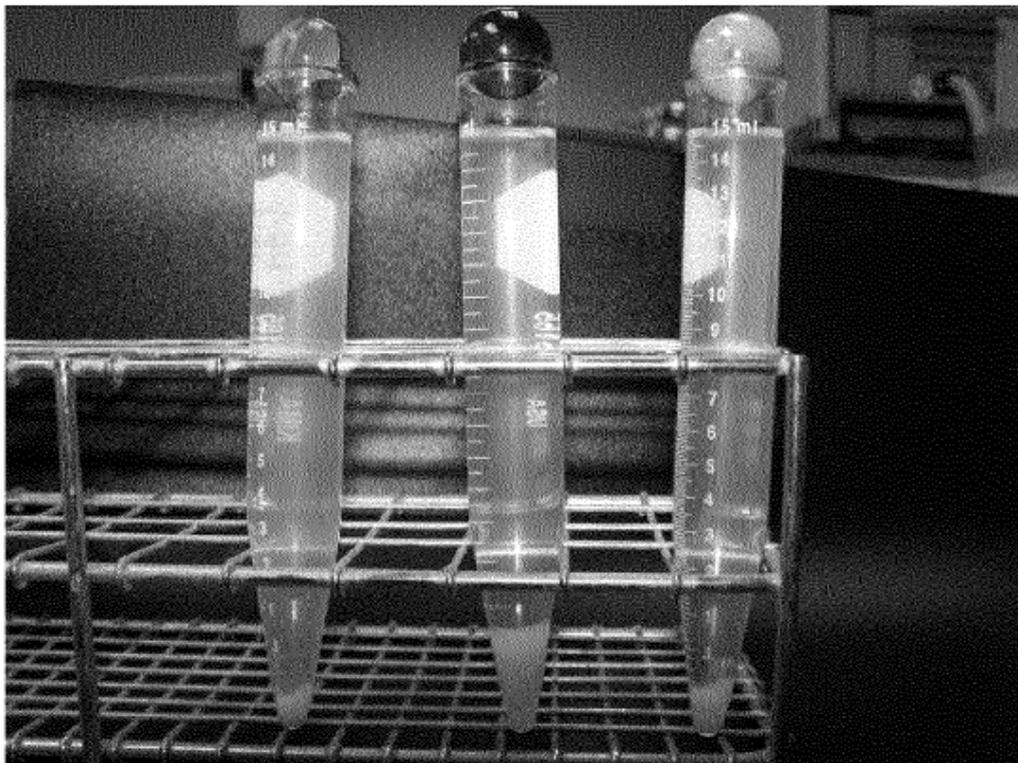


FIGURA 7

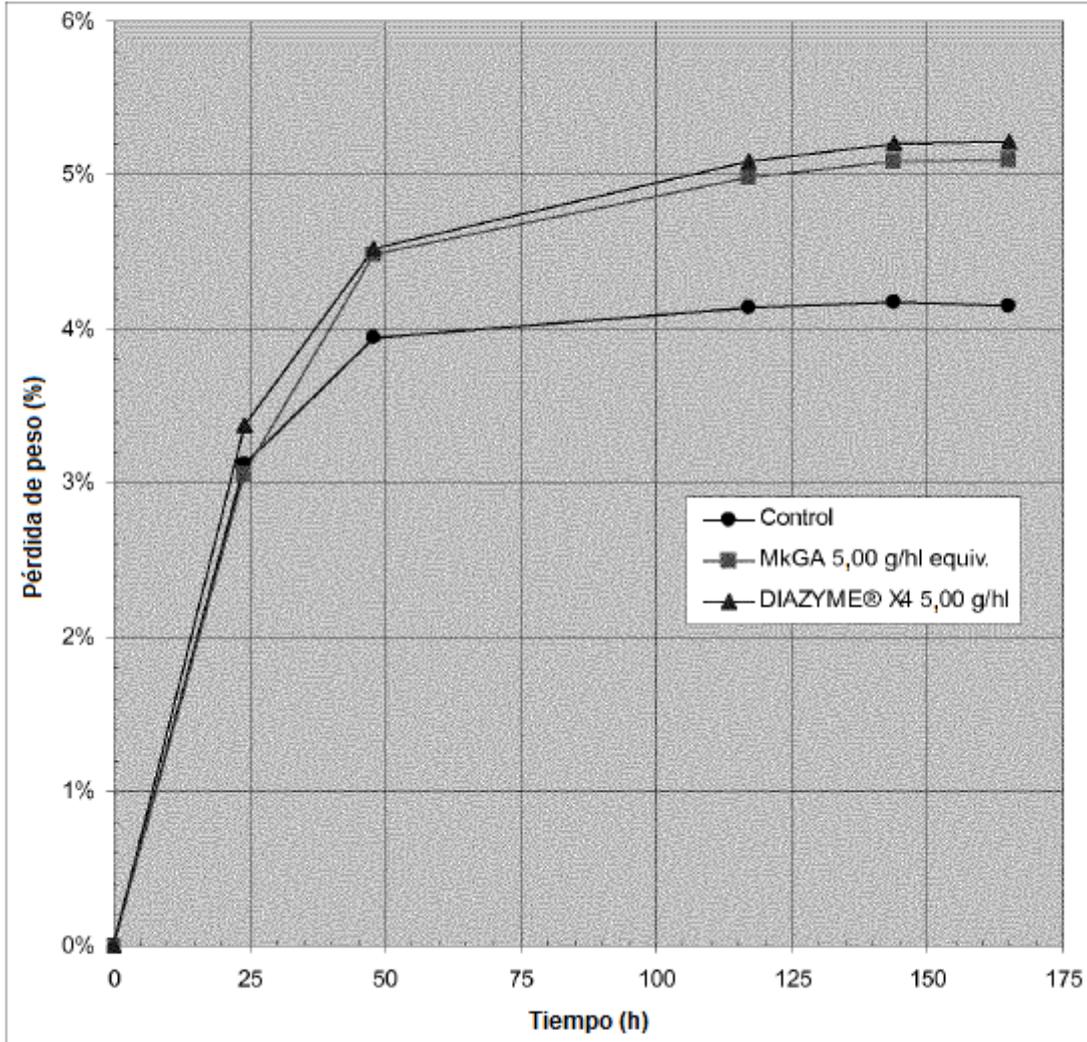


FIGURA 8

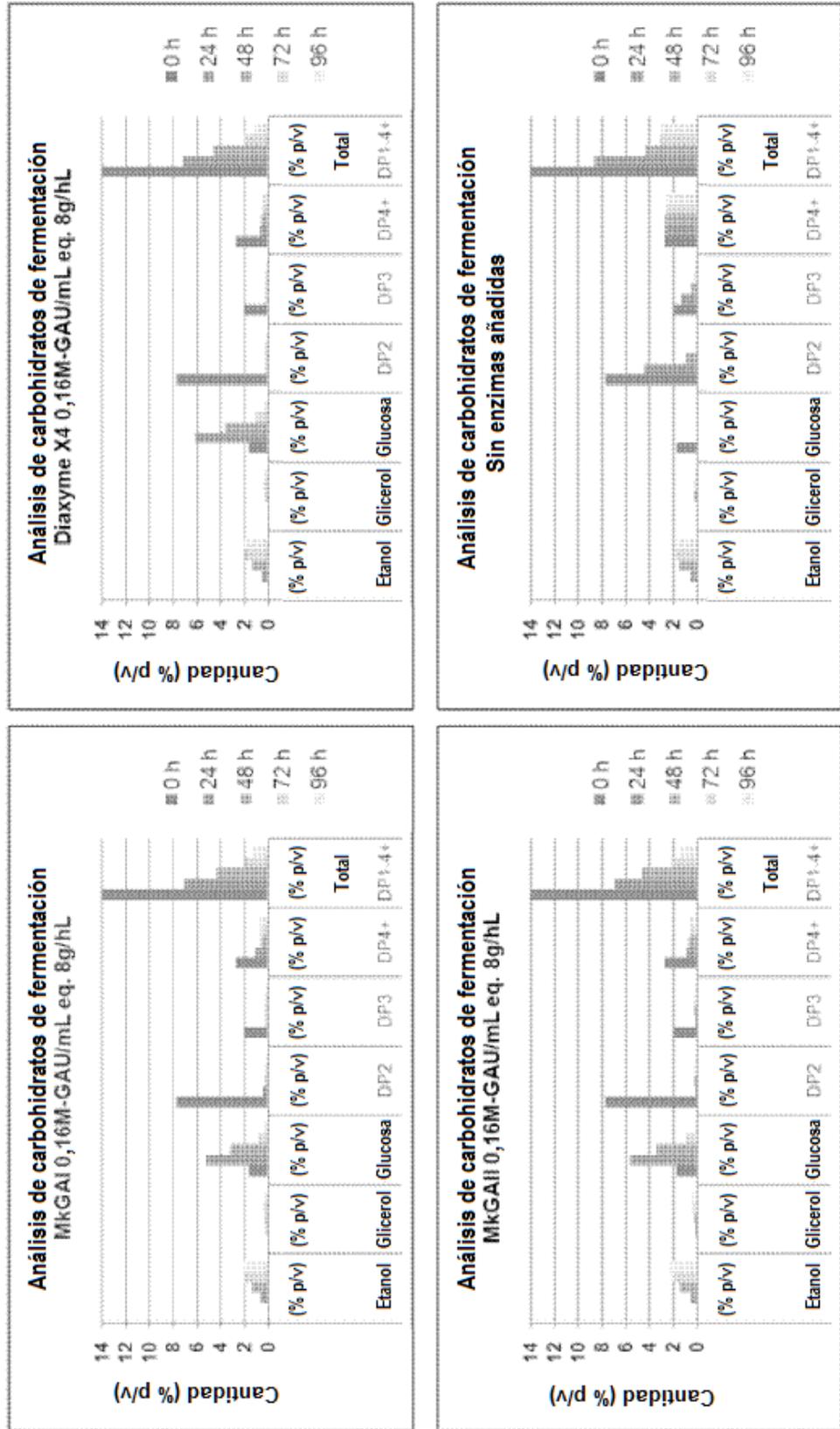


FIGURA 9

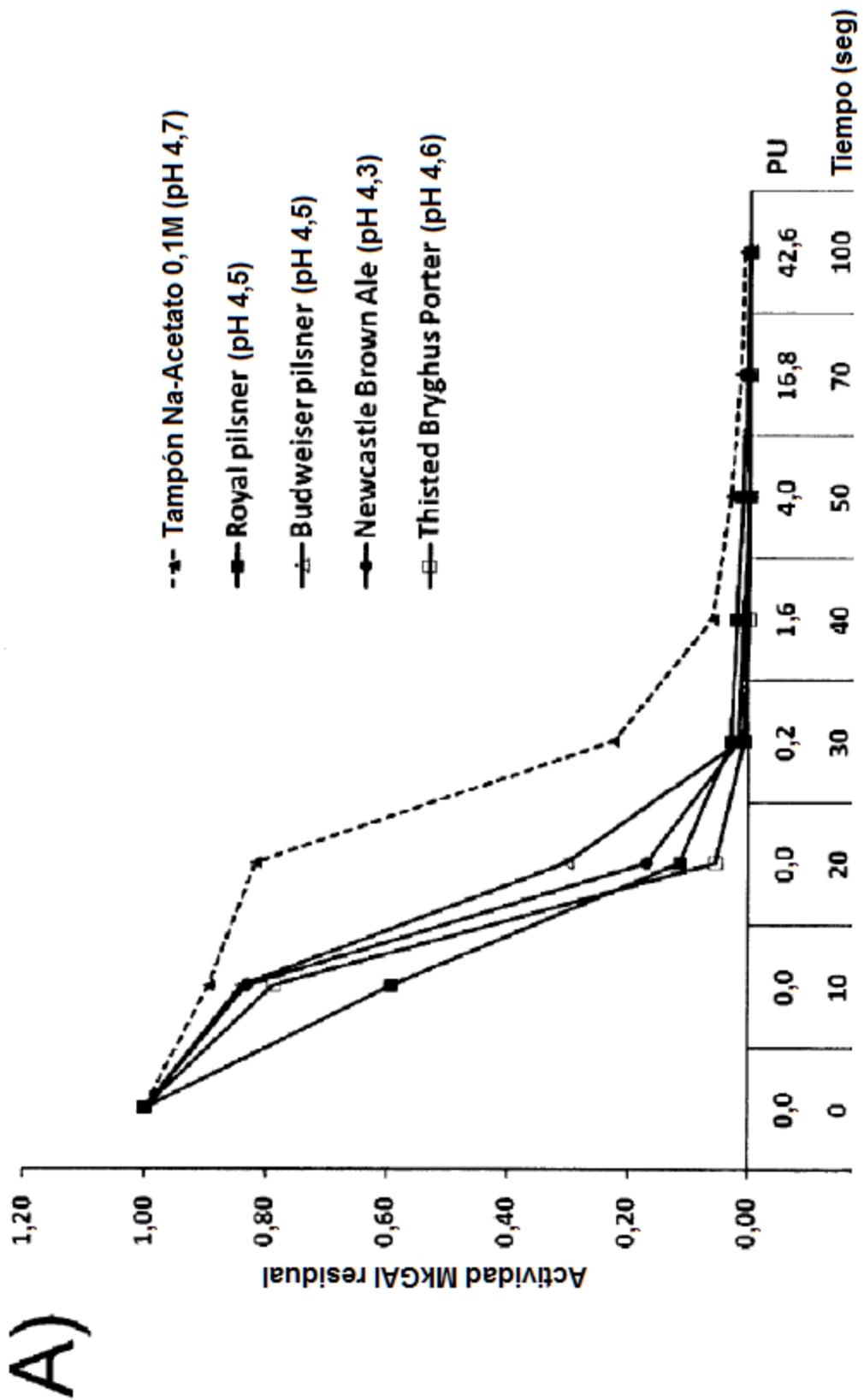


FIGURA 9 (cont.)

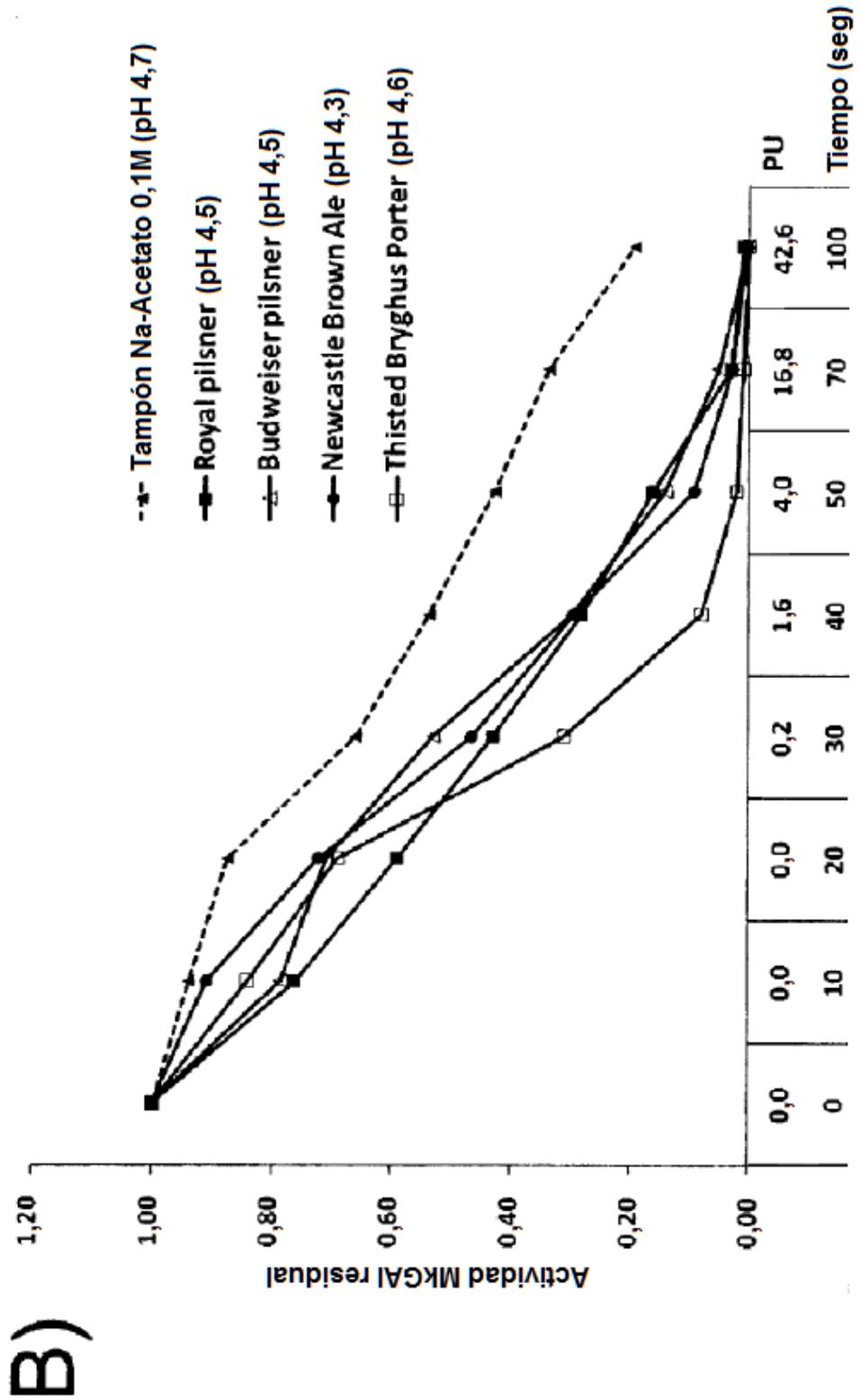


FIGURA 9 (cont.)

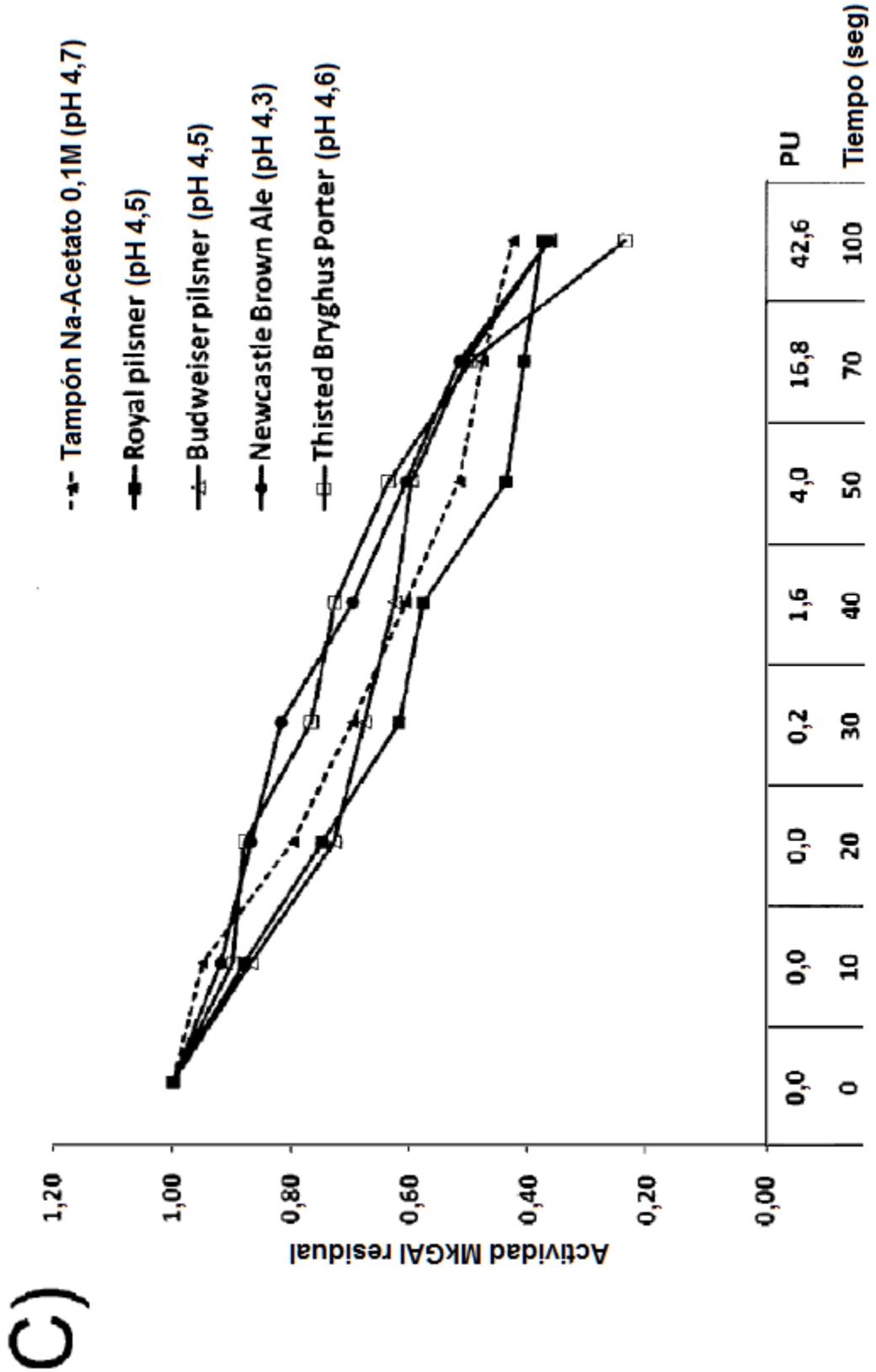


FIGURA 10

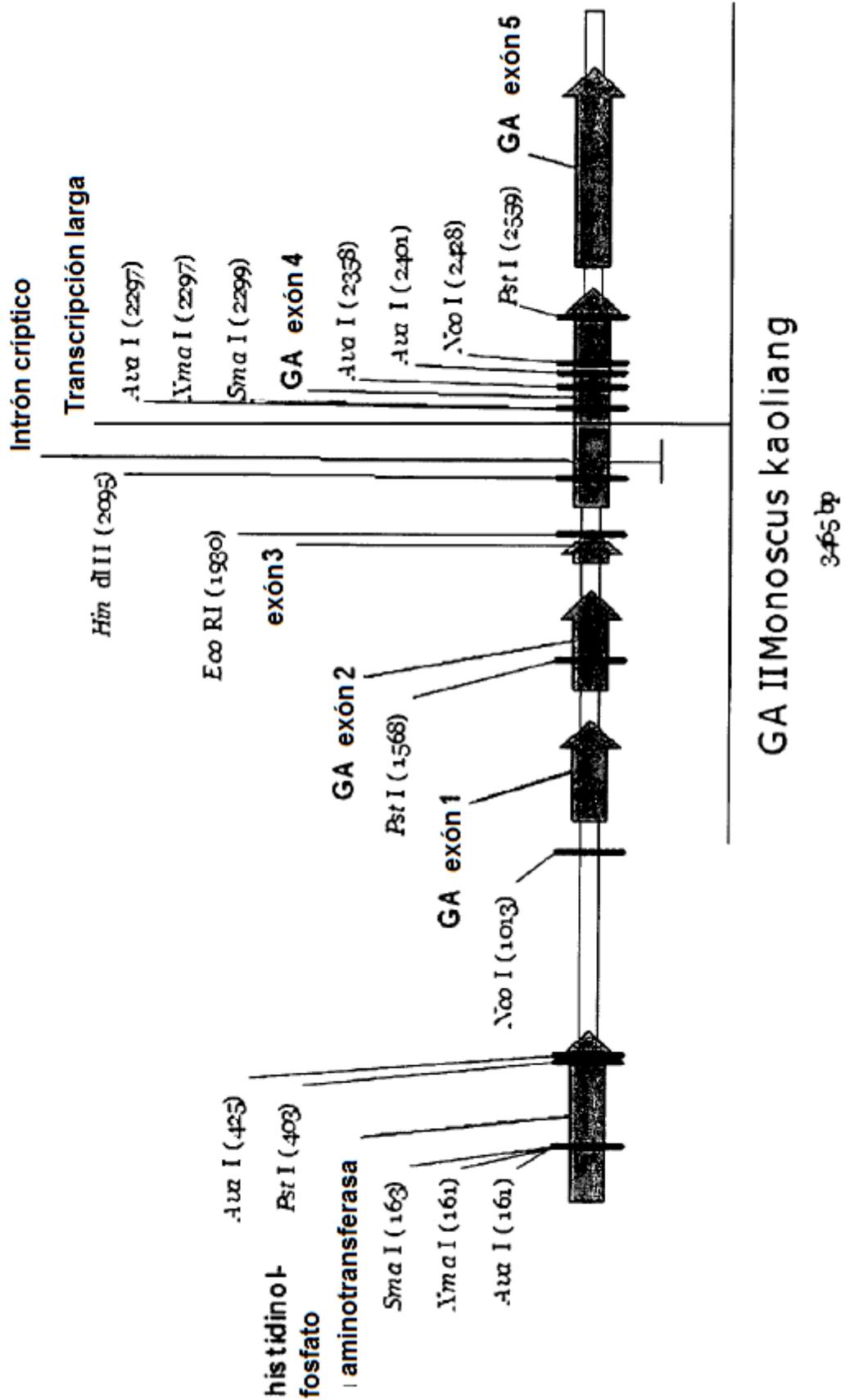


FIGURA 10 (cont.)

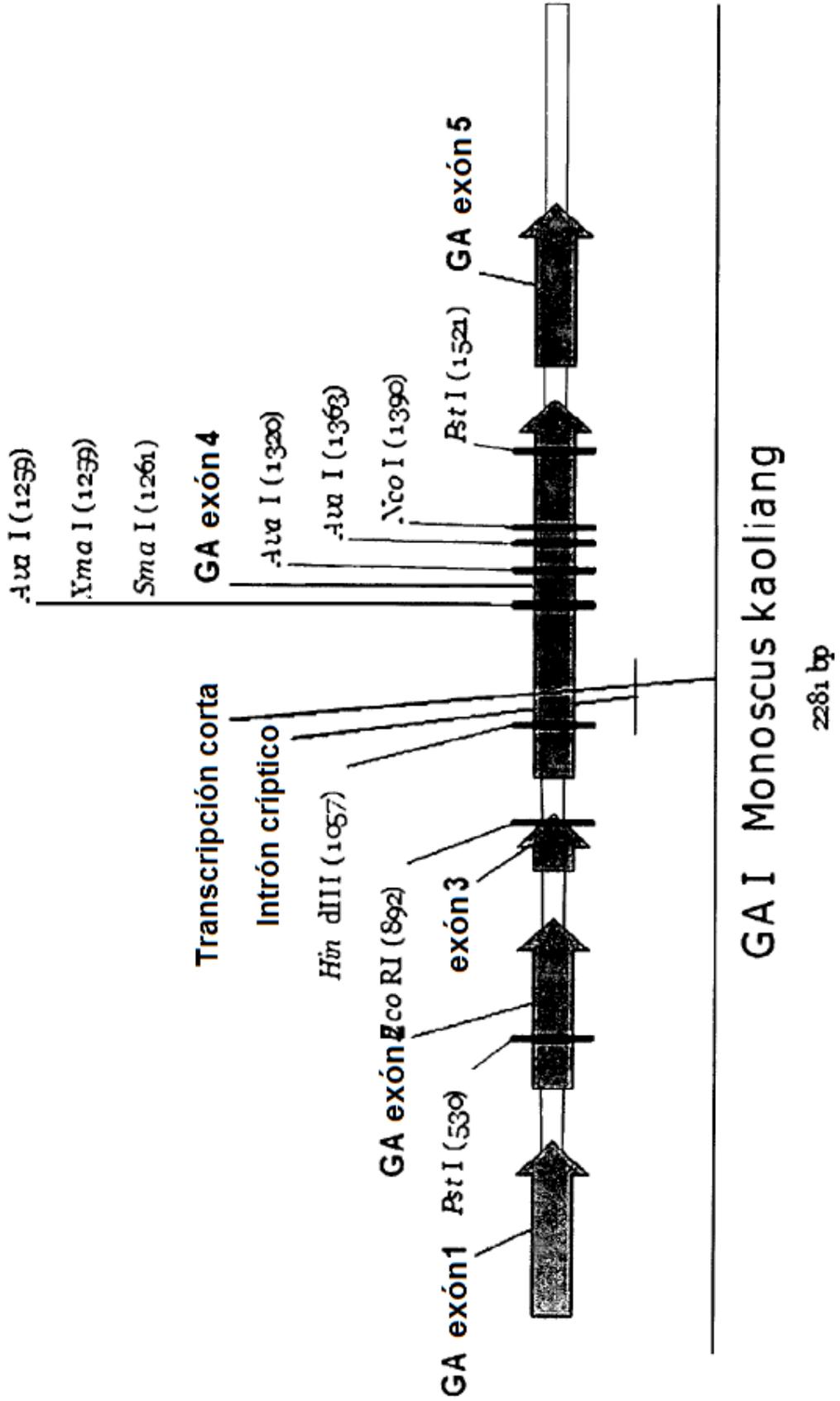


FIGURA 10 (cont.)

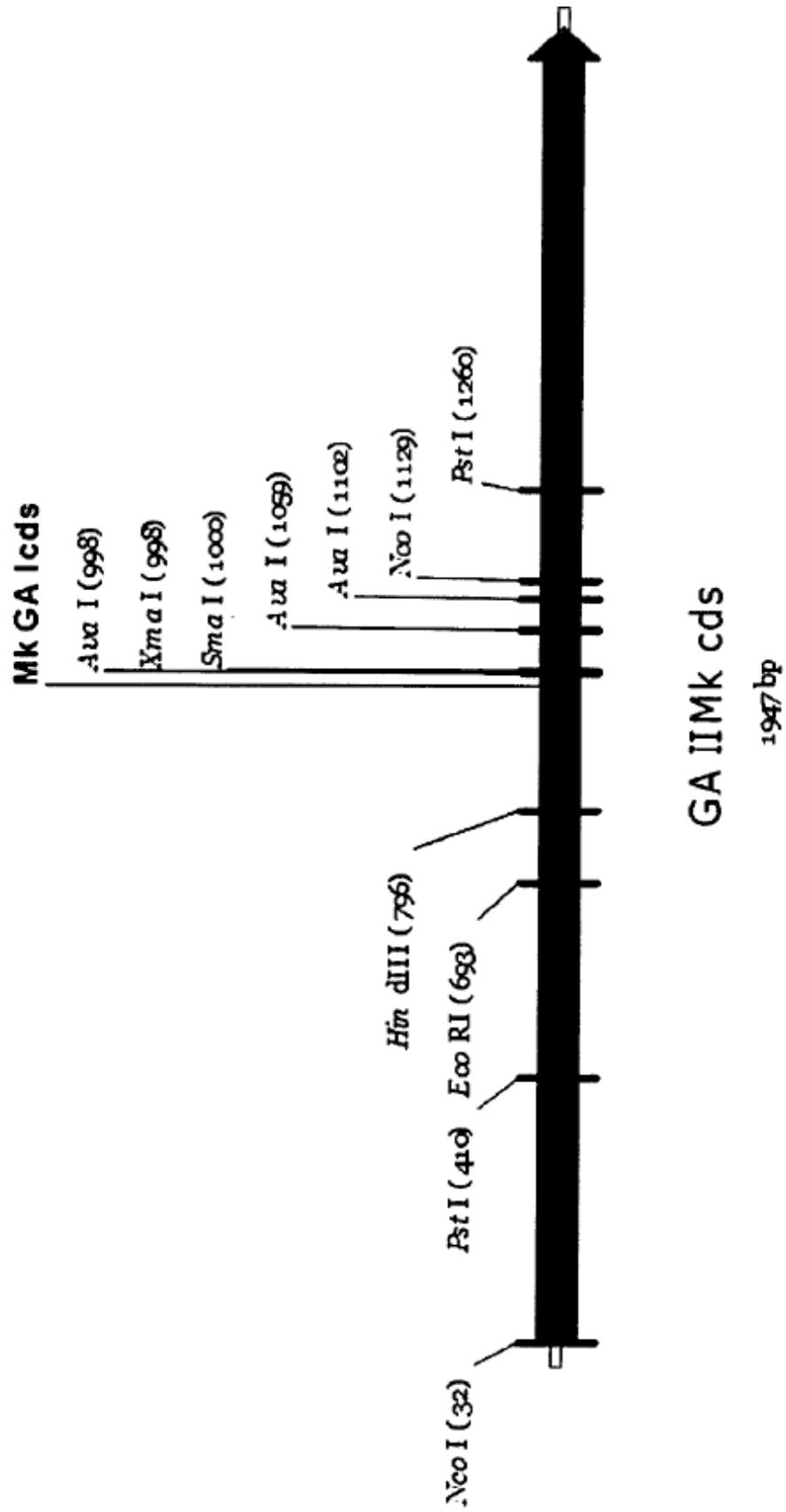


FIGURA 10 (cont.)

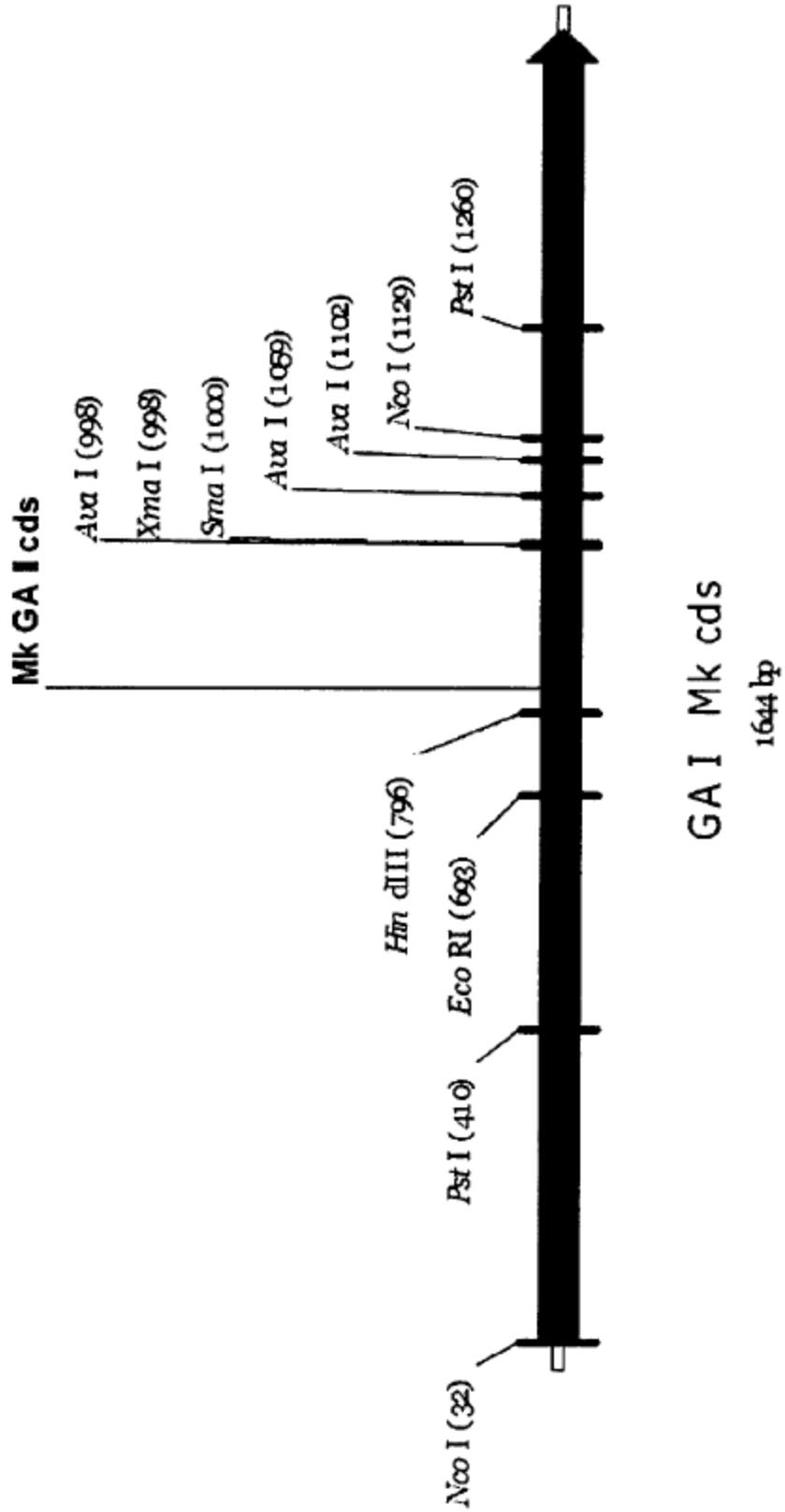


FIGURA 11

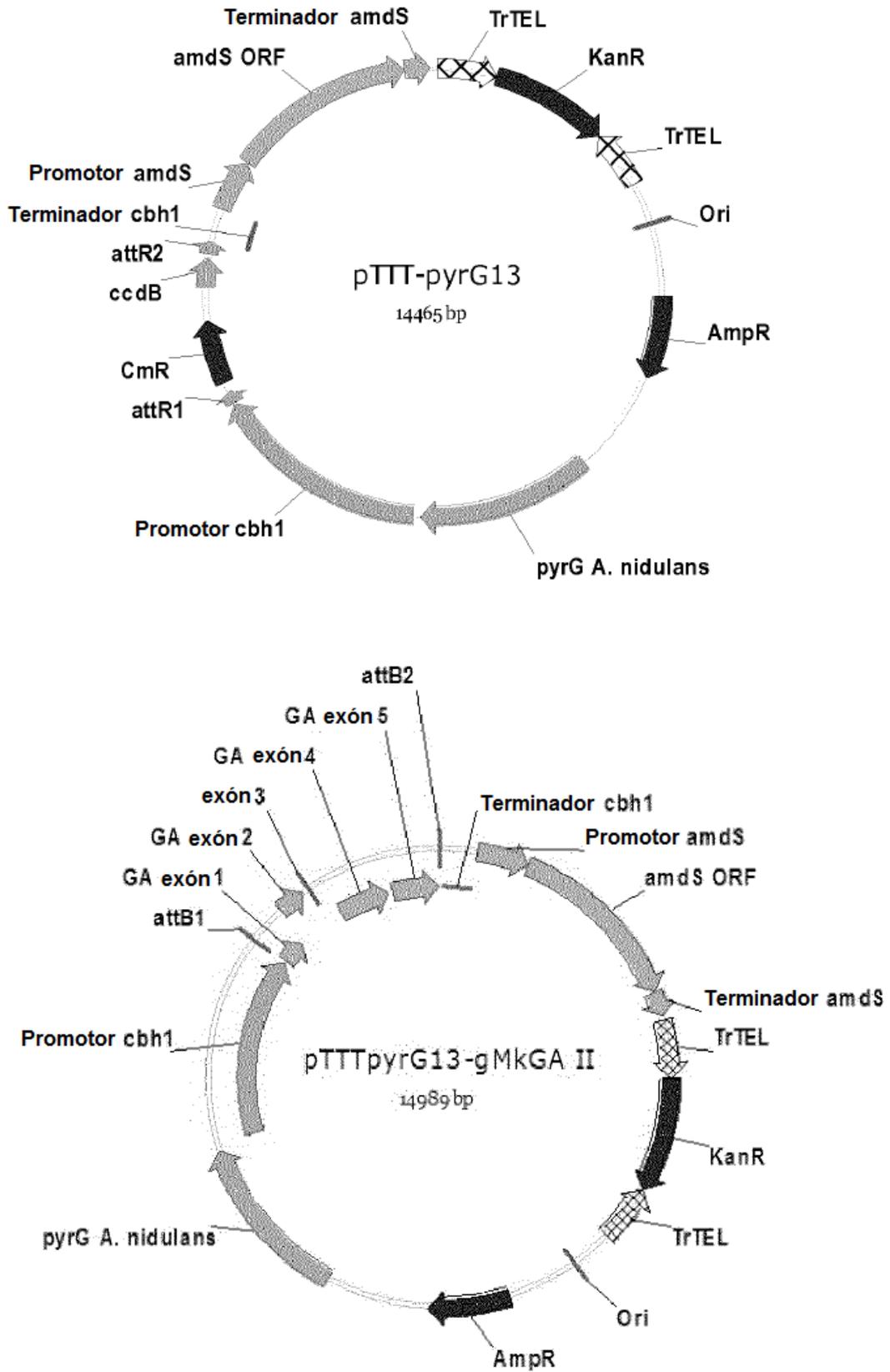


FIGURA 11 (cont.)

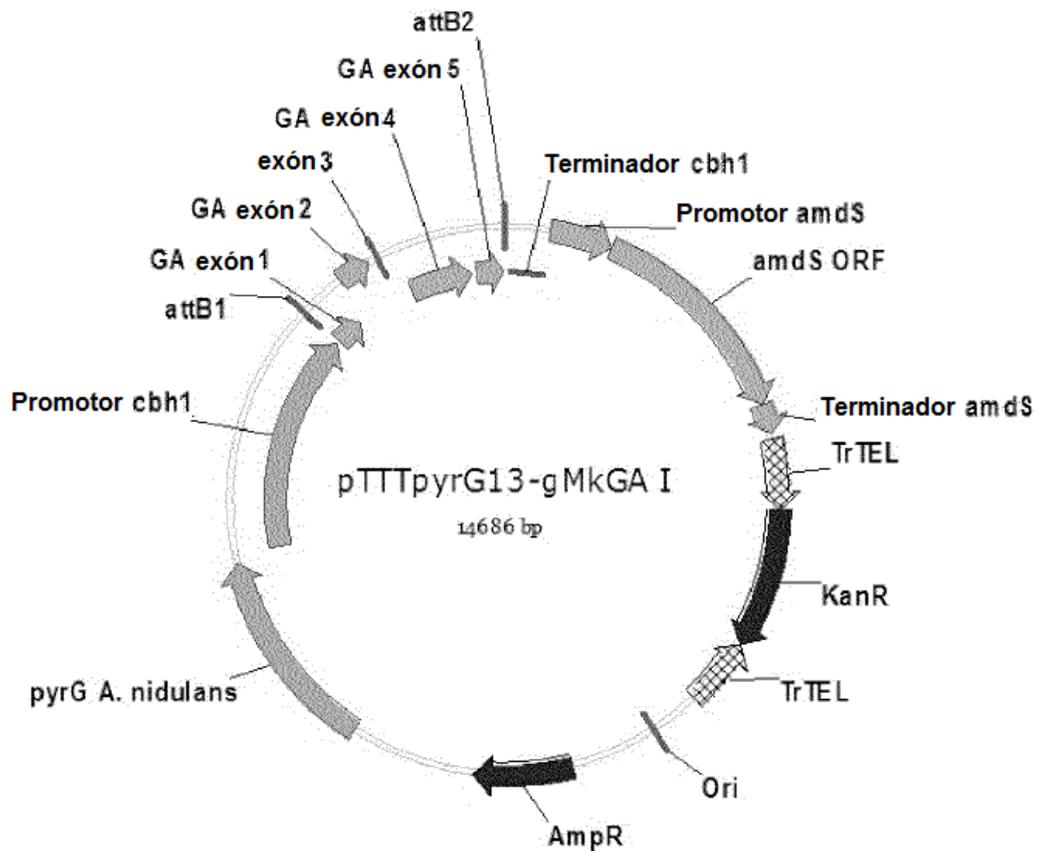
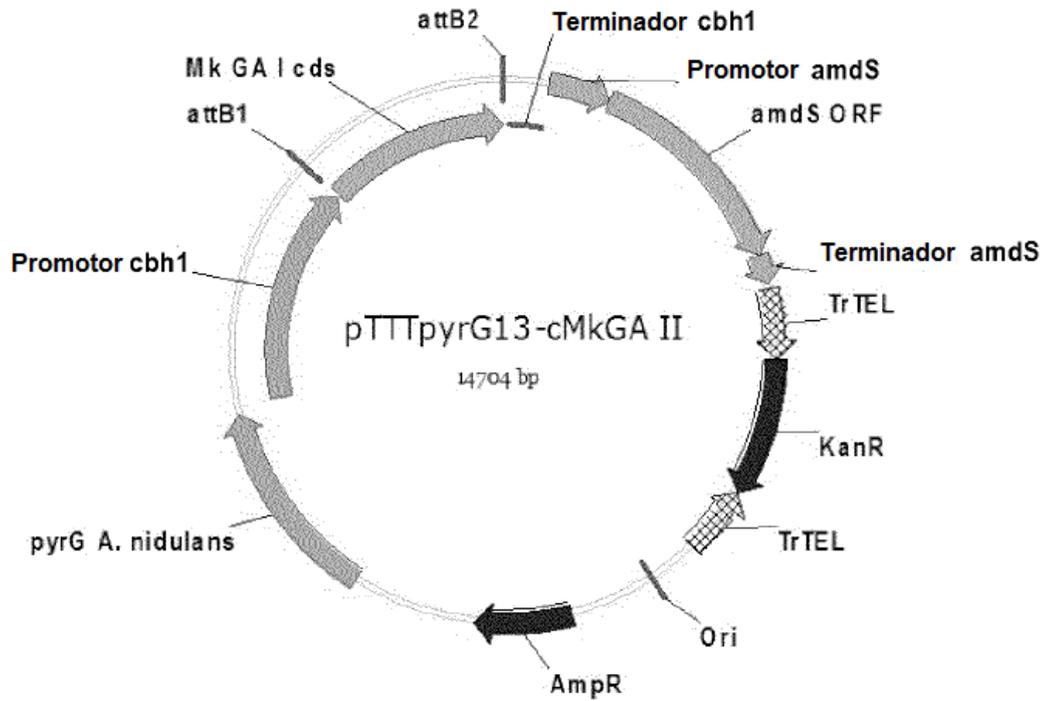


FIGURA 11 (cont.)

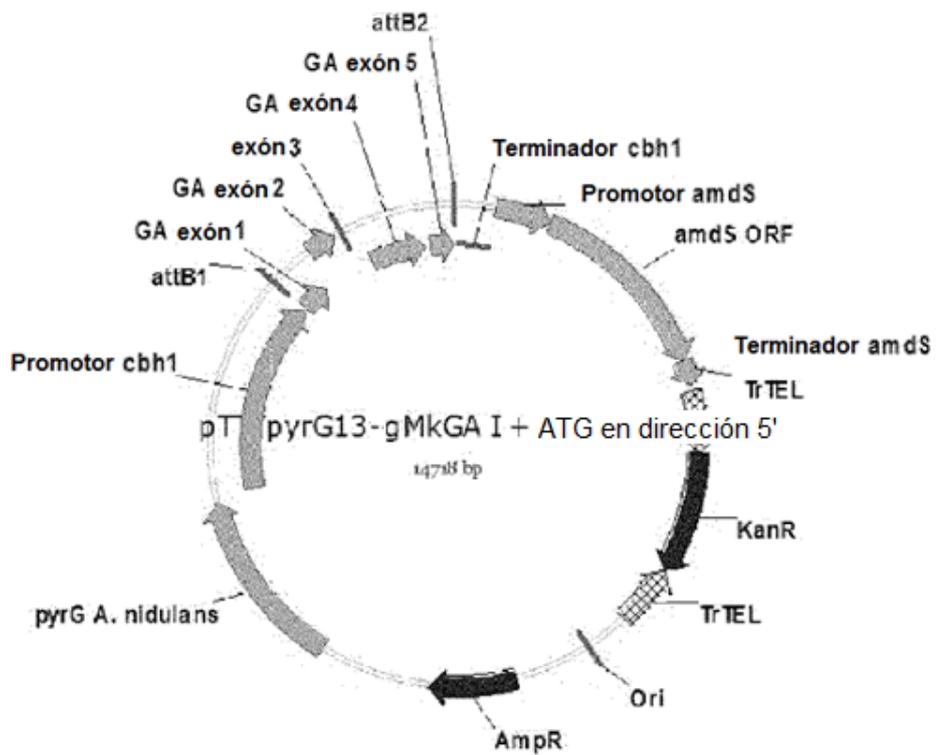
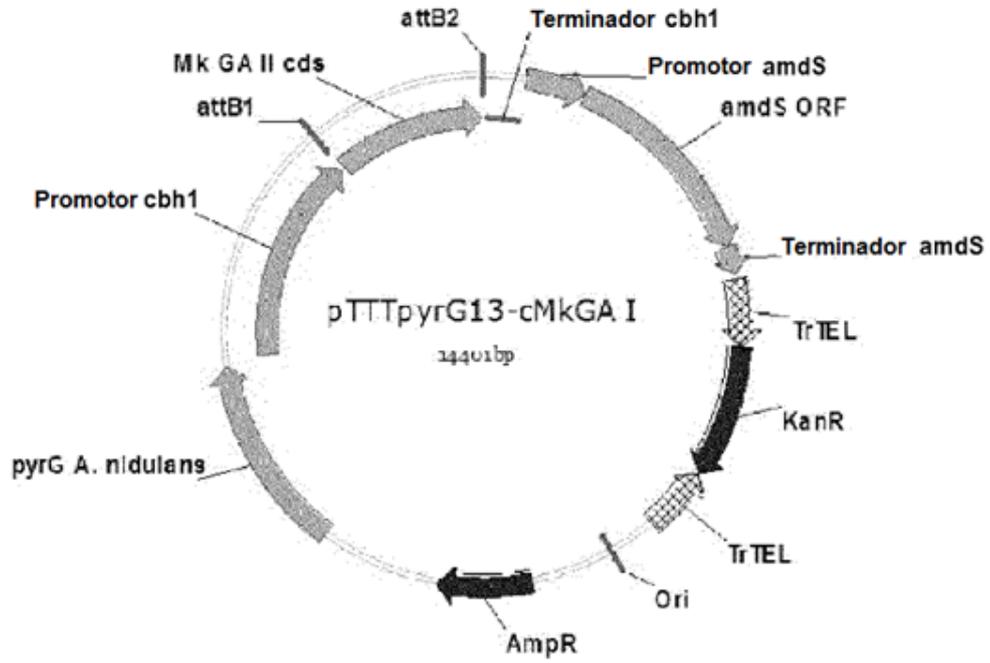
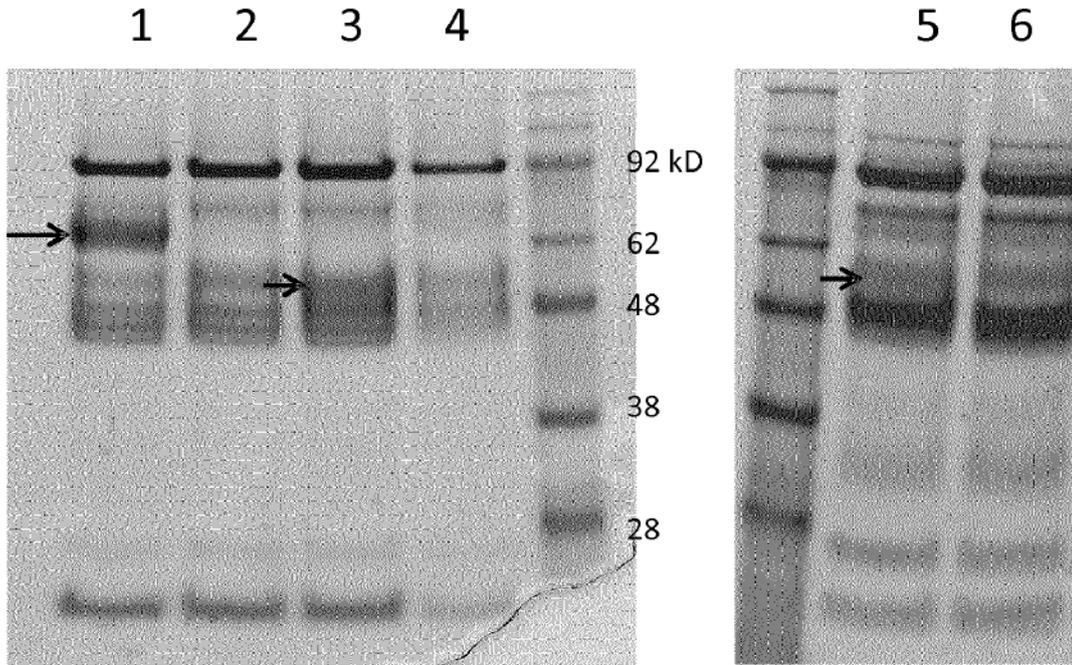


FIGURA 12



**FIGURA 13**

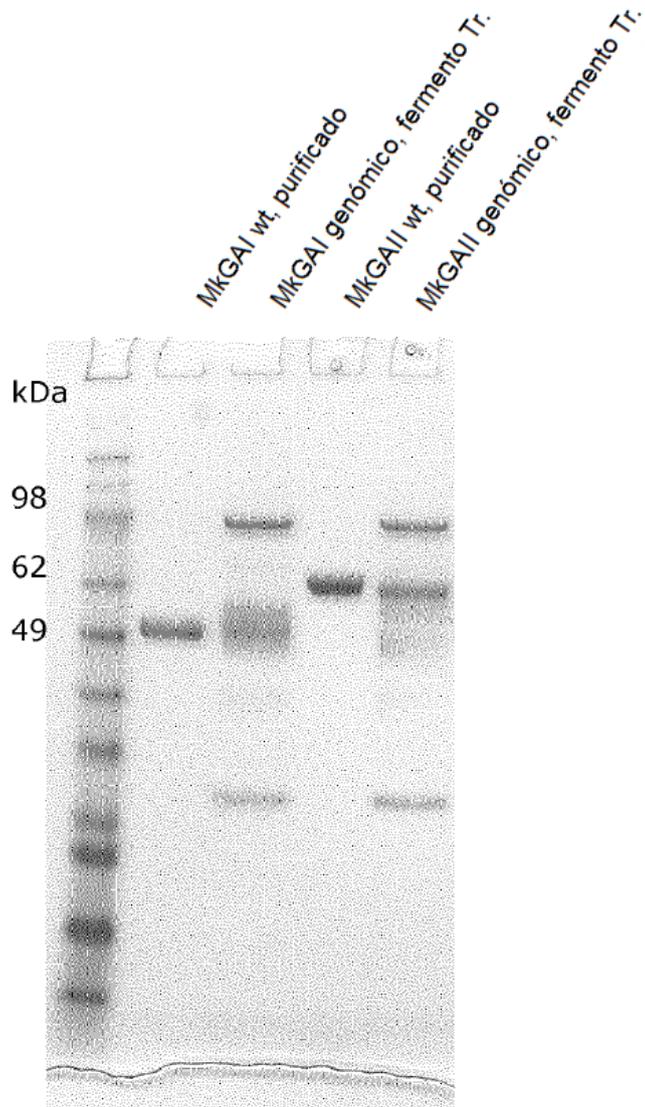


FIGURA 14

