

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 N.º de publicación: **ES 2 059 280**

21 Número de solicitud: 9300789

51 Int. Cl.⁶: C12N 1/19

C12G 1/022, C12P 7/04

//(C12N 1/19, C12R 1:865)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **16.04.93**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.11.94**

Fecha de concesión: **17.04.95**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.07.95**

45 Fecha de publicación del folleto de patente:
01.07.95

73 Titular/es: **Consejo Superior de
Investigaciones Científicas
Serrano 117
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Ramón Vidal, Daniel;
Gonzalez García, Ramón;
Pérez González, José Antonio y
Querol Simón, Amparo**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Levadura vínica CECT 1973, su método de obtención por técnicas de DNA recombinante y su aplicación como levadura vínica de uso industrial, útil para mejorar el aroma de los vinos.**

57 Resumen:

Levadura vínica CECT 1973, su método de obtención por técnicas de DNA recombinante y su aplicación como levadura vínica de uso industrial, útil para mejorar el aroma de los vinos.

Esta invención propone la expresión en levaduras vínicas de genes de otros organismos. En concreto hace referencia a la expresión de alguno de estos genes que codifican enzimas capaces de degradar los polímeros constituyentes de las paredes celulares vegetales, y cuya expresión en el mosto tiene influencia sobre el aroma del vino. El método se basa en el clonaje de los cDNAs de estos genes, la construcción de fusiones génicas entre estos cDNAs y promotores constitutivos de alta expresión en levadura vínica, y la introducción de estas construcciones recombinantes en cepas de levaduras vínicas de uso industrial. Experimentos de microvinificación con estas levaduras vínicas recombinantes demuestran la producción de un vino mejorado en su perfil de aroma.

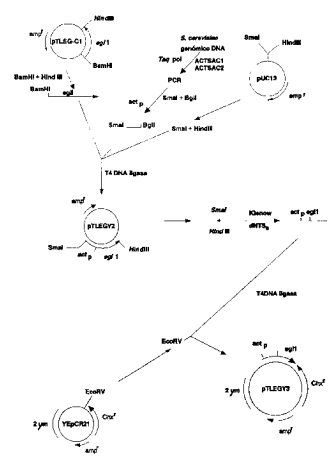


Figura 3

Aviso: Se puede realizar la consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Campo de la técnica.

5 Técnicas de ingeniería genética (C12N15)
Levaduras vínicas

Introducción.

10 Uno de los mayores productos mundiales de vinos, con una producción anual de aproximadamente 30 millones de Hl. La Comunidad Valenciana aporta una porporción importante a esta cifra. En esta comunidad autónoma el 90% de la producción se destina a la exportación, fundamentalmente, y en forma de vino embotellado, a Gran Bretaña, Alemania y Estados Unidos. Esta estrategia de ventas exige la producción de un vino de alta calidad.

15 Durante la época de la vendimia, en la región valenciana las condiciones climatológicas (temperatura, pluviosidad) varían considerablemente de un año a otro. Como consecuencia de ello la flora levaduriforme inicial del mosto es distinta y por ello el vino producido no presenta una uniformidad organoléptica a lo largo de las distintas campañas. Este problema es típico en los caldos producidos en regiones con clima mediterráneo, y para solventarlo algunos autores sugieren el uso de levaduras vínicas seleccionadas con las que inocular el mosto inicial, logrando una normalización de la flora microbiana que controla el proceso [Reed, G. y Nagodawithana, W. (1988), *Am. J. Enol. Vitic.* 39:83-90). En el caso de ciertas D.O. de la región valenciana como la D.O. Alicante, esto no es posible, ya que en esta zona las fermentaciones se caracterizan por una elevada temperatura y una alta concentración inicial de azúcares [Querol, A. Jimenez, M. y Huerta, T. (1990). *J. Food Sci.* 55: 1603-1606]. Bajo estas especiales condiciones, las levaduras vínicas comerciales no consiguen un desarrollo completo del proceso de fermentación. Para solucionar este problema algunos de los autores de esta invención llevaron a cabo la selección sobre mostos de la zona de una levadura endógena que, al encontrarse en el nicho ecológico propio, debía estar adaptada a estas condiciones de fermentación. Siguiendo un esquema de selección prefijado se aisló una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* demoninada T₇₃ [depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número CECT1894], que tanto en experimentos de microvinificación como en fermentación industriales es capaz de producir a partir de un mosto de la zona de vino de excelentes cualidades organolépticas de manera repetitiva campaña tras campaña [Querol, A., Huerta, T., Barrio, E. y Ramón, D. (1992). *J. Food Sci.* 57:183-185). En la actualidad esta cepa es comercializada por la firma canadiense Lallemand, habiendo sido utilizada durante las dos últimas campañas en distintas bodegas de la Comunidad Valenciana.

20 La presente invención hace referencia a un método para la expresión en levaduras vínicas de genes de otros organismos que codifican enzimas capaces de degradar polímeros constituyentes de la pared celular vegetal. La expresión de estos genes por parte de las levaduras vínicas recombinantes produce la secreción de los enzimas en ellos codificados al mosto, dando lugar a variaciones deseables en el aroma de los vinos.

Estado de la técnica

25 El uso de levaduras vínicas seleccionadas simplifica, desde el punto de vista microbiológico, el proceso de fermentación vínica. De una situación natural (fermentación no inoculada) en la que en el mosto inicial coexisten decenas de cepas distintas de la especie *S. cerevisiae*, produciéndose una sucesión de las mismas, se pasa a una situación forzada (fermentación inoculada) en la que la especie adicionada se impone al resto de las especies del mosto sin pérdida de la calidad organoléptica del producto final [Querol, A., Barrio, E., Huerta, T y Ramón, D. (1992). *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2948-2953]. Esta simplificación microbiológica abre toda una serie de posibilidades técnicas. Una de las más atractivas es, sin lugar a dudas, la posibilidad de modificar genéticamente el microorganismo responsable de la fermentación, en este caso la levadura vínica seleccionada. En otras levaduras industriales, como la levadura cervecera, se han desarrollado amplios programas de biología molecular encaminados a la obtención de cepas con nuevas características fenotípicas de interés [Hinchiffe, E. (1992), *J. Inst. Brew.* 98: 27-31]. Se han construido cepas capaces de secretar al medio β -(1,4)-endoglucanasas [Penttillä, M., Suihko, M.L., Lethinen, U., Nikkola, M. Y Knowles, J.K.C. (1987). *Curr.Genet.* 12: 413-420] o glucoamilasas (Vakeria, D. y Hinchiffe, E (1989). *Proceeding 22nd Congress EBC.* pp. 475-482. IRL Press. Zurich), obviando respectivamente los problemas de filtración debidos a los β -glucanos del mosto o eliminando los restos de almidón. Asimismo se han desarrollado cepas cerveceras capaces de no producir o eliminar el diacetilo, acortando los tiempos de fabricación (Blom-qvist, K., Suikho, M.L. Knowles, J. y Penttillä, M. (1991), *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2796-2803). La situación es bien distinta en la levadura vínica, en la que

tan sólo algunos autores han logrado mediante cruces genéticos clásicos la transmisión de factores killer [Boone, C., Sdicu, A.M., Wagner, J., Degré, R. Sanchez, C. y Bussey, H. (1990). *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 37-42] o la producción de ciertos terpenos [Javelot, C., Patrick, G., Coloma -Ceccaldi; B. y Vedescu, B. (1991) *J. biotechnol.* 21: 239-251] desde cepas de laboratorio a cepas industriales. Así mismo se ha descrito el clonaje de un gen de la bacteria *Lactobacillus delbrueckii* que codifica el enzima malolático de interés en enología. Este gen ha sido expresado tan solo en cepas de laboratorio [según Snow, S.R., Kunkee, R.A. y Williams, S.A. (1984), *European Pat. Appl.* 103399].

El aroma del vino depende en gran parte de la fracción volátil. De entre los distintos compuestos que forman esta fracción los alcoholes superiores, sus ésteres correspondientes y los terpenos parecen ser los mayores responsables del aroma final. En concreto el papel de estos últimos parece fundamental [Günata, Y.Z., Bayonove, C.L., Baumes, R.L. Y Cordonnier, R.E. (1986). *Am. J. Enol. vitic.* 37: 112-114]. Estos compuestos están presentes en el mosto en forma de dos fracciones: una en la que los terpenos están libres y contribuyen al aroma, y otra en la que se encuentran unidos a diglicósidos, fundamentalmente 6-O- α -L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranosidoso6-O- α -larabinofuranosil- β -D-glucopiranosidos [Gunata, Y.Z., Bayonove, C.L., Tapiero, C. y Cordonnier, E.R. (1990). *J. Agric. Food Chem.* 38: 1232-1236]. Esta segunda fracción no contribuye al aroma, es mayoritaria, no sufre modificaciones durante el proceso de vinificación y, evidentemente constituye una fuente potencial de aromas, que en caso de ser explotada podría incrementar considerablemente la calidad final de los caldos.

Desde el punto de vista tecnológico, la liberación de aromas desde esta segunda fracción es posible con tratamientos a altas temperaturas en medio ácido, pero la dureza de los mismos provoca cambios indeseados en los terpenos [Williams, P.J., Strauss, C.R. y Wilson, b. (1981). *Am. J. Enol. Vitic.* 32 230-235]. Por el contrario, una hidrólisis enzimática es menos destructiva y más efectiva. Recientemente se ha determinado que la hidrólisis enzimática de estos compuestos tiene lugar en dos pasos. En el primero, la unión entre los azúcares es rota por la actuación de una α -L-arabinofuranosidasa o una α -L-ramnosidasa, rindiendo el monoterpil β -D-glucósido correspondiente. Posteriormente, una β -glucosidasa corta el enlace β -glucosídico y libera el terpeno libre con capacidad aromática [Günata, Y.Z., Brillouet, J.M., Voirin, S., Baumes, R. y Cordonnier, R. (1990). *J. Agric. Food Chem.* 38: 772 -776]. Varios grupos de investigadores han estudiado la influencia sobre el aroma del vino de la adición al mosto de enzimas exógenos, fundamentalmente α -L-arabinofuranosidasas y β -glucosidasas [Günata, Y.Z., Bayonove, C.L., Cordonnier, R., Arnaud, A. y Galzy, P (1990). *J. Sci. Food. Agric.* 50: 499-506; Günata, Y.Z., Dugelay, I., Sapis, J.C., Baumes, R. y Bayonove, C. (1990). *J. Int. Sci. Vigne Vin* 24: 133-144; Shoseyov, O., Bravdo, B.A., Siegel, D., Goldman, A., Cohen, S., Shoseyov, L. e Ikan, R. (1990). *J. Agric. Food Chem.* 38: 1387-1390]. En todos los casos estudiados se ha podido determinar el incremento en la liberación de terpenos aromáticos, abriendo la posibilidad del uso industrial de estas enzimas, y, probablemente, de otros que al actuar sobre sustratos parecidos den lugar a un efecto similar. En este sentido, la presente invención demuestra como una β -(1,4)-endoglucanasa aumenta la liberación de 2-fenil etanol y terpenos al mosto, incrementando el aroma frutal del mismo.

Breve descripción de la invención.

Resulta de extraordinario interés industrial la expresión en levaduras vínicas de genes de otras especies cuyos productos génicos dan lugar a transformaciones deseables del mosto. Entre todas ellas hay una que destaca, la potenciación de la capacidad para liberar aromas, ya que un incremento controlado del mismo repercutirá en la calidad final de los vinos.

Para conseguir esto, la presente invención parte de una determinada secuencia (SEQ ID NO 1) de DNA genómico del hongo filamentoso *Trichoderma longibrachiatum* que codifica una actividad β -(1,4)-endoglucanasa, que a su vez comprende: a) la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada en dicho fragmento de DNA; y b) la secuencia de DNA que constituye el cDNA del gen que codifica dicha función β -(1,4)-endoglucanasa.

Se construye un bloque de expresión del cDNA mencionado bajo el control del promotor *act* de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual se expresa en cepas de laboratorio de la especie *S. cerevisiae*, en otras cepas industriales (vínicas, cerveceras o panaderas), preferentemente la cepa vínica T₇₃(CECT1894).

Esta operación también puede hacerse construyendo un vector o bloque de expresión que comprenda alguna parte de las referidas secuencias de DNA y la expresión de cualquier construcción de DNA que contenga un gen que codifique una β -(1,4)-endoglucanasa en la levadura vínica T₇₃ (CECT1894).

La producción de vino, según la presente invención, se realiza por el inóculo de cepas recombinantes

que expresen enzimas, preferentemente β -(1,4)-endoglucanasas, capaces de degradar paredes celulares vegetales, liberando compuestos volátiles que varíen el aroma del vino.

Igualmente se contempla la producción de vino con adición al mosto de la mencionada proteína parcial o totalmente purificada y la producción de vino con adición de cualquier otra β -(1,4)-endoglucanasa, parcial o totalmente purificada.

Esta invención difiere sustancialmente de los logros obtenidos hasta la fecha en la manipulación genética de levaduras vínicas industriales, los cuales han sido reseñados con anterioridad, al proponer la introducción de cepas industriales de genes de interés en enología en contraste con la expresión del gen maloláctico, realizado en cepas de laboratorio [Snow, S.R., Kunkee, R.E., Hodges, R.A. y Williams, S.A. (1984) *European Pat. Appl.* 103399]. Asimismo las mejores genéticas en esta invención se introducen mediante técnicas de DNA recombinante y no mediante cruces genéticos clásicos [Boone, C., Sdicu, A.M., Wagner, J., Degré, R., Sáchez, C. y Bussey, H. (1990). *Am. J. Enol. vitic.* 41: 239-251].

Descripción detallada de la invención.

Muchos hongos filamentosos producen, en determinadas condiciones de cultivo, enzimas extracelulares de degradar los polímeros estructurales de la pared celular vegetal (celulasas y hemicelulasas). Algunos de los genes que codifican estas actividades en distintos hongos filamentosos han sido clonados, e incluso expresados en cepas de laboratorio de la especie *S. cerevisiae* [Penttilä, M.E., André, L., Saloheimo, M., Lehtovaara, P. y Knowles, J.K.C. (1987). *Yeast* 3: 175-185]. La presente invención consiste en la expresión de uno de estos genes, en concreto el gen *egl1* del hongo filamentoso *Trichoderma longibrachiatum* que codifica una β -(1,4)-endoglucanasa, en una levadura vínica de uso industrial.

El gen *egl1* de *T. longibrachiatum*, se clonó a partir de una genoteca genómica utilizando como sonda en condiciones de hibridación heteróloga un fragmento de PCR que contenía parte del gen homólogo de *Trichoderma reesei* [van Arsdell, J.N., Kwok, S., Schweickart, V.L., Ladner, M., Gelfand, D.H. e Innis, M.A. (1987). *Bio/technology* 5: 60-64]. A partir de mRNA obtenido desde micelio inducido, y mediante una modificación de la técnica de PCR/RACE [Frohman, M.A., Dush, M.K. y Martin, G.R. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. - USA* 85: 8998-9002] se clonó el DNA copia (cDNA) del gen. Por técnicas clásicas de biología molecular, dicho cDNA se puso bajo el control del promotor del gen *act* de *S. cerevisiae* (Ng, R. y Abelson, J. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3912-3916) que codifica para la actina (esta señal reguladora es un promotor constitutivo con un alto nivel de expresión), y el conjunto se clonó en un plásmido con un marcador de resistencia a cicloheximida. Tanto cepas de laboratorio de la especie *S. cerevisiae* como la levadura vínica T₃₃ (CECT1894) se transformaron con esta construcción, y los clones transformantes se seleccionaron por la adquisición de resistencia a la cicloheximida (Del Pozo, L., Abarca, D., Claros, M.G. y Jiménez, A. (1991). *Curr. Genet.* 19: 353-358).

En algunos de los clones transformantes se comprobó la presencia del gen *egl1* por análisis de Southern, así como la secreción al medio de cultivo de la proteína *egl1* en el codificada por análisis Western, y su actividad β -(1,4)-endoglucanasa por ensayo enzimático. Con alguno de estos transformantes se llevaron a cabo experimentos de microvinificación, detectándose la secreción de EGL1 al mosto y su actividad biológica. Sobre los caldos producidos se llevó a cabo un análisis organoléptico por parte de un panel de catadores expertos, detectándose importantes diferencias en cuanto a aroma en aquellos caldos producidos por la adición de levadura recombinante. Todos estos cambios hicieron referencia al aumento de aroma frutal. Finalmente, por cromatografía de gases se analizó la fracción volátil de estos caldos, detectándose un incremento de hasta tres veces en el contenido de 2-fenil etanol, butanol y alcohol isometílico.

Ejemplos

Ejemplo 1.

Clonaje del gen *egl1* de *T. longibrachiarum*.

Se construyeron dos oligonucleótidos sintéticos ENDOGLUA (5' -GGCGCCCTCAGTTACAC-3') y ENDOGLUB (5'-AAGGCATTGCGAGTAGT-3'), correspondiente respectivamente a la hebra codificante del extremo 5' y la hebra complementaria del extremo 3' del gen *egl1* de *Trichoderma reesei* (van Arsdell, J.N., Kwok, S., Schweickart, V.L., Ladner, M. Gelfand, D.H. e Innis, M.A. (1987). *Bio/technology* 5: 60-64). Usando estos dos oligonucleótidos, se llevó a cabo una reacción de PCR sobre DNA genómico de *T. reesei* CECT2414 usando el enzima taq polimerasa. La amplificación consistió en 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 52°C y 1 minuto a 72°C. De esta forma se amplificó un fragmento de 1.7

kb que se digirió con los enzimas de restricción *KpnI* y *SacI* y se clonó en el vector pBluescriptII SK + [Alting-Meese, M.A. y Short, J.M. (1989). *Nucl. Acids Res.* 17: 1994], previamente digerido con los mismos enzimas, mediante el uso del enzima T4 DNA ligasa. El plásmido recombinante se denominó pTREG1 (Figura 1), y sus extremos se secuenciaron usando el método de los dideoxinucleótidos terminadores de cadena [Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467), confirmándose el clonaje del gen *egl1* de *T. reesei* por comparación con la secuencia anteriormente publicada [van Arsdell, J.N., Kwok, S., Schweickart, V.L., Ladner, M., Gelfand, D.H. e Innis, M.A. (1987). *Bio/technology* 5: 60-64].

Usando el plásmido pTREG1 como sonda se llevó a cabo un análisis de southern sobre restricciones de DNA genómico de *T. longibrachiatum* CECT2606. Para ello, a muestras de DNA genómico de este hongo se les adicionó respectivamente los enzimas de restricción *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *PstI* o *Sau3A*. Las muestras se incubaron a 37°C durante 2 horas, se corrieron en un gel de agarosa al 0,7%, y se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa [Southern, E. (1975), *J. Mol. Biol.* 98: 503-517]. Finalmente, el filtro se hibridó con el plásmido pTREG1 marcado radioactivamente con ³²P-(dATP) por la técnica de "random primed" [Feinberg, A.P. y Vogelstein, B. (1983). *Anal. Biochem.* 132: 6-13]. Para los cinco enzimas, en el genoma de *T. longibrachiatum* se detectaron bandas únicas de homología al gen *egl1* de *T. reesei* (12 kb para *BamHI*, 15 kb para *EcoRI*, 7 kb para *HindIII*, 3.5 kb para *PstI* y 1.7 kb para *Sau3A*). Utilizando la información relativa a las restricciones *HindIII* y *Sau3A*, y siguiendo la metodología tradicional [Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Cold Spring Harbor*, New York), se construyeron genotecas de *T. longibrachiatum* CECT2606 en el plásmido vector pUC18 [Yanisch-Perron, C., Vierira, J. y Messing, J. (1985). *Gene* 33: 103-119) digerido respectivamente con los enzimas *BamHI* e *HindIII*, seleccionando fragmentos sólo en el rango de tamaños en el que se detectaron las bandas de homología. Estas genotecas se escrutaron utilizando como sonda el fragmento de 1.7 kb *KpnI-SacI* del plásmido pTREG1, obteniéndose una serie de clones positivos que contenían el inserto *Sau3A* de 1.7 kb o el inserto *HindIII* de 7 kb. Se tomó un plásmido representativo de cada uno de ellos, denominados respectivamente pTLEG1 y pTLEG7, sobre los que se llevaron a cabo análisis de restricción, determinándose el mapa de restricción de los insertos que aparece en la Figura 2.

Tomando como base el plásmido pTLEG1, se llevaron a cabo delecciones seriadas utilizando los enzimas exonucleasas III y nucleasa S1 [Henikoff, S. (1984). *Gene* 28: 351-359], obteniéndose una serie de moldes solapantes para su secuenciación. Utilizando el método de los terminadores de cadena anteriormente mencionado, se llevó a cabo la secuencia completa de las dos hebras del fragmento de 1.7 kb *Sau3A*. Dicha secuencia es la SEQ ID NO 1, y se encuentra depositada en la base de secuencias GENBank con el número de acceso X60652.

La secuencia de dicho fragmento revela la presencia en el mismo de una pauta de lectura abierta de 1573 nucleótidos, correspondiente al gen *gell* de *T. longibrachiatum*. Esta pauta de lectura está interrumpida por la presencia de dos intrones de 123 y 61 pares de bases y codifica para una proteína de masa molecular 48341.

Ejemplo 2.

Clonaje del cDNA del gen egl1 de T. longibrachiatum y expresión del mismo bajo el control del promotor act de S. cerevisiae en cepas de levadura de laboratorio y codifica para una proteína de masa molecular 48341, cuya secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO 2.

Matraces de medio mínimo [Pontecorvo, G., Roper, J.A., Jemmons, L.J., MacDonald, K.D. y Buft, A.W.J. (1953). *Avd. Genet.* 5: 141-238] con carboximetilcelulosa al 1% como fuente de carbono, se inocularon con 105 esporas/ml de *T. longibrachiatum* CECT2606, y se llevaron a incubación orbital (200 rpm) a 30°C durante 36 horas. Pasado este tiempo se recogió el micelio y se detectó la presencia de actividad endoglucanasa en el medio de cultivo. Se obtuvo RNA total del micelio inducido [Ramón, D.(1987). Tesis Doctoral. Universitat de València] y, a partir de esta preparación, RNA mensajero (mRNA) mediante el uso de una columna de oligo-dT-celulosa [Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Cold Spring Harbor*, New York].

Para sintetizar el cDNA del gen *egl1* se llevó a cabo una amplificación por PCR utilizando una modificación de la técnica RACE [Fromhan, M.A., Dusch, M.K. y Martin, G.R. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8998-9002]. Una alícuota del mRNA se transcribió en reverso utilizando el enzima transcriptasa reversa del virus AMV y un oligonucleótido denominado

RACEA (5'-CGGTCGACTGCAGAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'),

que contiene secuencias de reconocimiento para los enzimas *HindIII*, *PstI* y *SalI*. Para ello se llevó a cabo una incubación a 42°C durante una hora, seguida de otra incubación a 52°C durante 30 minutos. Para polimerizar el cDNA de *egl1* se usaron dos oligonucleótidos. Uno de ellos, el denominado

5 ENDOGLUC (5'-TGCGGATCCTCCTCCATAGTTGTCAGAAATGGC-3')

es similar al extremo 5' del gen *egl1*, contiene integra la secuencia alrededor del codón de iniciación, pero se ha modificado para crear un sitio de restricción artificial *BamHI*. El otro oligonucleótido, denominado

10 RACEB(5'-CGGTGCGACTGCAGAAGCTT-3'),

es idéntico al oligonucleótido RACEA, excepto que le falta toda la cola oligo-dT. La amplificación se llevó a cabo sobre una alícuota del producto de reacción de la transcriptasa reversa usando el enzima Taq polimerasa, y consistió en un ciclo de desnaturalización de los híbridos RNA-DNA de 95°C durante 5 minutos, seguido de un ciclo de anillamiento de 55°C durante 5 minutos, un ciclo de polimerización de 72°C durante 40 minutos, 40 ciclos de 95°C 40 segundos, 55°C un minutos y 72°C 3 minutos y un ciclo final de 72°C durante 15 minutos. El fragmento polimerizado se digirió con los enzimas de restricción *BamHI* e *HindIII* y se clonó en el plásmido pUC18 digerido con los mismos enzimas, rindiendo el plásmido pTLEG-C1 (Figura 4).

20 Para situar el cDNA del gen *egl1* bajo el control de un promotor fuerte y constitutivo de *S. cerevisiae*, se sintetizó un fragmento de DNA que contenía el promotor del gen *act de S. cerevisiae* [Ng. R. y Abelson, J. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 3912-3916]. El esquema completo del proceso aparece en la Figura 3. Para ello se llevó a cabo una polimerización por PCR sobre DNA genómico de la cepa *S. cerevisiae* CECT1395 usando Taq polimerasa y dos oligonucleótidos, denominados

25 ACTSAC1 (5'-GGGACCCGGGTAAGCTGCC-3') y

ACTSAC2 (5'-GCGTGAAAGATCTAAAAGCTGATGTAG-3'),

30 correspondientes a los flancos de la región promotora de dicho gen, y en los que se introdujeron sitios de restricción artificiales *SmaI* y *BglIII* respectivamente. Las condiciones de polimerización fueron 30 ciclos de 95°C cuarenta segundos, 55°C un minuto dos, seguidos de un ciclo final de 72°C cinco minutos. El fragmento de polimerización que contenía el promotor del gen *act* se digirió con los enzimas de restricción *SmaI* y *BglIII*, y se unió con la ayuda de T4 DNA ligasa, por un lado al fragmento *BamHI -HindIII* del plásmido pTLE-G-C1 que contenía el cDNA del gen *egl1*, y por otro al plásmido vector pUC13 [Yanisch-Perron, C., Vierira, J. y Messing, J. (1985). *Gene* 33: 103-119] digerido con los enzimas *SmaI* e *HindIII*. De esta forma se obtuvo el plásmido pTLEGY2 (Figura 4), en el que el cDNA del gen *egl1* se encuentra bajo el control del promotor *act de S. cerevisiae*.

40 A partir de pTLEGY2 se obtuvo el fragmento *SmaI-HindIII* que contiene el bloque de expresión promotor-cDNA. Este fragmento se trató con el enzima Klenow DNA polimerasa en presencia de dATP, dCTP, dGTP y dTTP a 37°C durante 30 minutos, rellenándose los extremos de restricción. Por otra parte, el plásmido vector de levaduras YEpCR21 [Navas, L., Esteban, M. y Delgado, M.A. (1991). *J. Inst. Brew.* 97: 115-118) que contiene un marcador de selección de transformación por resistencia a cicloheximida, se digirió con el enzima de restricción *EcoRV* que genera extremos romos. Este vector y el fragmento relleno del bloque de expresión se trataron con T4 DNA ligasa, rindiendo el plásmido pT-LEGY3. Este plásmido (Figura 4) contiene el gen *egl1* de *T. longibrachiatum* bajo el control del promotor *act de S. cerevisiae*, así como un marcador de selección de transformación por resistencia a cicloheximida en *S. cerevisiae*.

50 Siguiendo la metodología tradicional [Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Cold Spring Harbor, New York*] se purificaron grandes cantidades del plásmido pTLEGY3. Un cultivo de la cepa de laboratorio *S. cerevisiae* S-150-2B se transformó por el protocolo del acetato de litio [Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. y Kimura, A. (1983). *J. Bacteriol.* 153: 163-168] con pTLEGY3, seleccionando los clones transformantes en medio con cicloheximida a 1 µg/ml. Sobre algunos de los clones transformantes se comprobó la presencia del gen *egl1* de *T. longibrachiatum* por análisis de Southern, así como la secreción de una actividad endoglucanólítica mediante ensayo en medio sólido. Para ello, los transformantes se repicaron en placas de medio rico con cicloheximida, y tras la aparición de las colonias se añadió una sobrecarga de carboximetilcelulosa al 0,5% en tampón acetato sódico 50 mM pH 4.5 con agar al 0.7%. 60 Tras incubar varias horas a 37°C, se añadió 5 ml por placa de una solución de Rojo Congo 1 mg/ml en agua destilada, detectándose la aparición de halos de degradación.

Finalmente, en alguno de los transformantes se llevaron a cabo crecimientos en medio líquido con cicloheximida, comprobándose la secreción de la proteína EGL1 mediante análisis de Western usando un anticuerpo anti-EGL1, así como la actividad del enzima mediante ensayo enzimático con un kit comercial de la firma Biocon, utilizando como sustrato azo- β -glucanos de cebada.

5
Ejemplo 3.

Expresión del gen egl1 bajo el control del promotor act de S. cerevisiae en la cepa vínica T₇₃ (CECT1894).

10 Siguiendo la misma metodología descrita en el ejemplo 2, se transformaron células de la levadura vínica T₇₃ (CECT1894) con el plásmido pTLEGY3. Se seleccionó uno de los transformantes, que se depositó en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de acceso CECT1973, y sobre el mismo, y siguiendo las mismas metodologías que en el ejemplo anterior, se detectó la presencia del gen egl1, la
15 secreción de la proteína EGL1, así como la actividad β -(1,4)-endoglucanasa por ensayo enzimático.

Ejemplo 4.

Ensayos de microvinificación con la cepa vínica recombinante S. cerevisiae CECT1973.

20 La cepa vínica recombinante CECT1973 se inoculó a una concentración de 10^5 ufc/ml en frascos con 1.5 litros de mosto de uva Monastrell estéril, llevándose a cabo el proceso de microvinificación en condiciones estándar [Querol, A., Huerta, T., Barrio, E. y Ramón, D. (1992). *J. Food Sci.* 57: 183-185]. Como controles se inocularon fermentaciones con la cepa vínica T₇₃ (CECT1894) sin transformar, y
25 transformada con el vector de transformación YEpCR21. Se tomaron muestras cada día de fermentación, y sobre las mismas se determinó la actividad endoglucanasa (Tabla 1). Como se observa en la misma, en el caso de la cepa recombinante CECT1973 es posible detectar actividad endoglucanasa en el mosto desde el inicio de fermentación. Por análisis Western es posible detectar la presencia de proteína EGL1 en el mosto fermentado por la cepa recombinante CECT1973. En ninguno de los controles, la cepa sin
30 transformar o la cepa transformada con YEpCR21, se detectó la proteína EGL1 o una actividad endoglucanasa relevante.

Sobre los mostos finales producidos en la fermentación de la cepa recombinante CECT1973 y los dos
35 controles se llevó a cabo una purificación de compuestos volátiles, los cuales se analizaron por cromatografía de gases usando una columna *Carbowax 20M*. Las condiciones de trabajo fueron las mismas que se usaron en trabajos anteriores [Querol, A., Huerta, T., Barrio, E. y Ramón, D. (1992). *J. Food Sci.* 57: 183-185]. En el caso de la cepa recombinante se pudo comprobar un incremento en la cantidad de 2-fenil etanol y otros picos correspondientes a terpenos. Un análisis organoléptico de los mostos finales, llevado a cabo por un panel de expertos, correlacionó la fermentación de la levadura recombinante CECT1973
40 con la producción de mostos con un incremento en el aroma frutal, frente a los caldos producidos por las cepas control. Esta es una característica deseable en los caldos de calidad.

45 (Tabla I pasa a página siguiente)

50

55

60

ES 2 059 280 B1

Tabla I

Actividad endoglucanasa en mostos obtenidos por inóculo de distintas cepas de S. cerevisiae. Las cifras indican actividad en U por ml de mosto.

Días de fermentación	T ₇₃ (CECT1894)	T ₇₃ /YEpCR21	T ₇₃ /pTLEGY3 (CECT1973)
1	3.0	3.12	5.28
2	3.6	4.2	12.84
3	4.92	3.6	23.04
4	3.24	6.36	34.08
6	4.2	4.32	53.88
8	3.84	5.4	53.4
9	4.44	4.94	46.92
10	4.8	6.0	63.2
12	5.04	4.56	53.52
14	4.92	5.64	58.92
15	4.56	4.56	57.60
16	3.84	6.0	59.52

Descripción de las figuras.

Figura 1. Mapa de restricción del plásmido pTREG1. El segmento blanco corresponde al fragmento de DNA genómico de *T. reesei* que contiene el gen gell.

Figura 2. Mapa de restricción de los insertos *HindIII* de 7kb (arriba) y *Sau3A* de 1.7 kb (abajo) del genoma de *T. Longibrachiatum* que contienen el gen egl1. Las abreviaturas corresponden a: E, *EcoRI*; H, *HindIII*; Hp, HpaI; N, NcoI; P, PstI; S, *Sau3A*; Sm, SmaI; Sp, SphI; X, XbaI y Xh, XhoI.

Figura 3. Esquema de la construcción de los plásmidos pTLEGY2 y pTLEGY3.

Figura 4. Mapa de restricción del plásmido pTLEGY3.

(Lista de secuencias pasan a página siguiente)

ES 2 059 280 B1

Lista de secuencias

SEQ ID NO: 1

5 Longitud de la secuencia expresada en número de pares de aminoácidos: 1566
 Tipo: DNA genómico. Doble hélice. Lineal
 Origen: *Trichoderma longibrachiatum*

10

5' GGA TCCTCCATAG TTGTCAAGAA 23

ATG GCG CCC TCA GCT ACA CTG CCG TTA ACC ACG GCC ATC CTA GCC 68

ATT GGC CGG CTC GTC GCA GCC CAG CAG CCG GGC ACC AGC ACC CCC 113

15 GAG GTC CAT CCC AAG CTG ACA ACC TAC AAG TGC ACA ACG TCG GGG 158

GGA TGC GTG GCC CAG GAC ACC TCC GTC GTG CTC GAC TGG AAC TAC 203

CGC TGG ATG CAC GAC GCG AAC TAC AAC TCG TGC ACC GTC AAC GGC 248

GGC GTC AAC ACC ACG CTG TGC CCG GAC GAG GCG ACC TGC GGG AAG 293

20 AAC TGC TAC ATC GAG GGC GTC GAC TAC GCC GCC TCG GGC GTC ACC 338

GCC TCG GGC AGC ACC CTC ACC CTG AAC CAG TAC ATG CCC AGC AGC 383

TCC GGC GGC TAC AGC AGC GTC TCT CCG CGG CTG TAC CTC CTG GGC 428

25 CCC GAC GGC GAG TAC GTG ATG CTC AAG CTC AAC GGC CAG GAG CTG 473

AGC TTC GAC GTC GAC CTC TCG GCG CTG CCG TGC GGC GAG AAC GGC 518

TCG CTG TAC CTG TCC CAG ATG GAC GAG AAC GGG GGC GCG AAC CAG 563

TAC AAC ACG GCC GGT GCC AAC TAC GGG AGC GGC TAC TGC GAT GCC 608

30 CAG TGC CCC GTC CAG ACG TGG CCG AAC GGC ACC CTC AAC ACG AGC 653

GGC CAG GGC TTC TGC TGC AAC GAG ATG GAT ATC CTC GAG GGC AAC 698

TCG CGG GCC AAT GCG CTG ACT CCC CAC TCC TGC ACG GCT ACG GCC 743

TGC GAC TCT GCC GGT TGC GGC TTC AAC CCC TAT GGC AGC GGC TAC 788

35 CCG AAC TAC TTC GGC CCC GGA GAC ACC GTC GAC ACC TCC AAG ACC 833

TTC ACC ATC ATC ACC CAG TTC AAC ACG GAC AAC GGC TCG CCG TCG 878

GGC AAC CTC GTC AGC ATC ACC CGC AAG TAC CGG CAG AAC GGC GTC 923

GAC ATC CCC AGC GCC AAG CCC GGC GGC GAC ACC ATC TCG TCG TGC 968

40 CCG TCC GCC TCG GCC TAC GGC GGC CTC GCC ACC ATG GGC AAG GCC 1013

CTC AGC AGC GGC ATG GTG CTC GTC TTC AGC ATC TGG AAC GAC AAC 1058

AGC CAG TAC ATG AAC TGG CTC GAC AGC GGC AGG GCC GGC CCC TGC 1103

AGC AGC ACC GAG GGC AAT CCG TCC AAC ATC CTG GCC AAT AAC CCC 1148

45 GGC ACC CAC GTC GTC TAC TCC AAC ATT CGC TGG GGA GAC ATT GGG 1193

TCT ACT ACT AAC TCG ACC GGC GGT AAC CCT CCG CCG CCG CCG CCG 1238

CCG GCT TCT AGC ACG ACT TTT TCG ACT ACT AGG AGG AGC TCG ACG 1283

ACT TCG AGC AGT CCC AGC TGC ACG CAG ACT CAC TGG GGC CAG TGC 1328

50 GGT GGC ATT GGG TAC ACC GGG TGC AAG ACC TGC ACG TCG GGC ACT 1373

ACC TGC CAG TAT GGC AAC GAC TAC TAC TCG CAA TGC CTC TAG 1415

AGCTTGACCT TGTGTCTAGC CTGTCCGGAC GTGGGTTACTA TCATACGATG 1465

CGGACAAGCA GGGAAATCGT AGACATTGGG CTGCATATCA GGAGCAGAGC 1515

55 ATGCTATATT GTATCTACGT TAGCAAAAAG AAAAAAAAAA AAAAAAAGCT T 3' 1566

60

SEQ ID NO: 2

Tipo: Proteínas

Origen: *Trichoderma longibrachiatum*

5

N, Met Ala Pro Ser Ala Thr Leu
-20

10 Pro Leu Thr Thr Ala Ile Leu Ala Ile Gly Arg Leu Val Ala Ala
-15 -10 -5

Gln Gln Pro Gly Thr Ser Thr Pro Glu Val His Pro Lys Leu Thr
1 6 11

15 Thr Tyr Lys Cys Thr Thr Ser Gly Gly Cys Val Ala Gln Asp Thr
16 21 26

Ser Val Val Leu Asp Trp Asn Tyr Arg Trp Met His Asp Ala Asn
31 36 41

20 Tyr Asn Ser Cys Thr Val Asn Gly Gly Val Asn Thr Thr Leu Cys
46 51 56

Pro Asp Glu Ala Thr Cys Gly Lys Asn Cys Tyr Ile Glu Gly Val
61 66 71

25 Asp Tyr Ala Ala Ser Gly Val Thr Ala Ser Gly Ser Thr Leu Thr
76 81 86

Leu Asn Gln Tyr Met Pro Ser Ser Ser Gly Gly Tyr Ser Ser Val
91 96 101

30 Ser Pro Arg Leu Tyr Leu Leu Gly Pro Asp Gly Glu Tyr Val Met
106 111 116

Leu Lys Leu Asn Gly Gln Glu Leu Ser Phe Asp Val Asp Leu Ser
121 126 131

35 Ala Leu Pro Cys Gly Glu Asn Gly Ser Leu Tyr Leu Ser Gln Met
136 141 146

Asp Glu Asn Gly Gly Ala Asn Gln Tyr Asn Thr Ala Gly Ala Asn
151 156 161

40 Tyr Gly Ser Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys Pro Val Gln Thr Trp
166 171 176

Arg Asn Gly Thr Leu Asn Thr Ser Gly Gln Gly Phe Cys Cys Asn
181 186 191

45 Glu Met Asp Ile Leu Glu Gly Asn Ser Arg Ala Asn Ala Leu Thr
196 201 206

Pro His Ser Cys Thr Ala Thr Ala Cys Asp Ser Ala Gly Cys Gly
211 216 221

50 Phe Asn Pro Tyr Gly Ser Gly Tyr Pro Asn Tyr Phe Gly Pro Gly
226 231 236

Asp Thr Val Asp Thr Ser Lys Thr Phe Thr Ile Ile Thr Gln Phe
241 246 251

55 Asn Thr Asp Asn Gly Ser Pro Ser Gly Asn Leu Val Ser Ile Thr
256 261 266

60

ES 2 059 280 B1

	Arg	Lys	Tyr	Arg	Gln	Asn	Gly	Val	Asp	Ile	Pro	Ser	Ala	Lys	Pro
	271					276					281				
5	Gly	Gly	Asp	Thr	Ile	Ser	Ser	Cys	Pro	Ser	Ala	Ser	Ala	Tyr	Gly
	286					291					296				
	Gly	Leu	Ala	Thr	Met	Gly	Lys	Ala	Leu	Ser	Ser	Gly	Met	Val	Leu
	301					306					311				
10	Val	Phe	Ser	Ile	Trp	Asn	Asp	Asn	Ser	Gln	Tyr	Met	Asn	Trp	Leu
	316					321					326				
	Asp	Ser	Gly	Arg	Ala	Gly	Pro	Cys	Ser	Ser	Thr	Glu	Gly	Asn	Pro
	331					336					341				
15	Ser	Asn	Ile	Leu	Ala	Asn	Asn	Pro	Gly	Thr	His	Val	Val	Tyr	Ser
	346					351					356				
	Asn	Ile	Arg	Trp	Gly	Asp	Ile	Gly	Ser	Thr	Thr	Asn	Ser	Thr	Gly
20	361					366					371				
	Gly	Asn	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Thr	Phe
	376					381					386				
25	Ser	Thr	Thr	Arg	Arg	Ser	Ser	Thr	Thr	Ser	Ser	Ser	Pro	Ser	Cys
	391					396					401				
	Thr	Gln	Thr	His	Trp	Gly	Gln	Cys	Gly	Gly	Ile	Gly	Tyr	Thr	Gly
	406					411					416				
30	Cys	Lys	Thr	Cys	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	Cys	Gln	Tyr	Gly	Asn	Asp
	421					426					431				
	Tyr	Tyr	Ser	Gln	Cys	Leu	C								
35	436					441									

REIVINDICACIONES

1. Levadura vínica, **caracterizada** por su número de identificación, *Saccharomyces cerevisae*/pTLEGYe y su n° de orden CECT1973, atribuido por la Autoridad Internacional de Depósitos.

5

2. Método de obtención de la levadura vínica identificada según la reivindicación 1, **caracterizado** por la expresión de las secuencias del cDNA que contenga un gen del hongo *Trichoderma longibrachiatum*, que codifica una actividad β -(1,4)-endoglucanasa, y cuya secuencia de nucleótidos, así como la de la proteína codificada, corresponde respectivamente a las secuencias SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, bajo el control del promotor act de *Saccharomyces cerevisiae*, en cepas de levadura industrial, preferentemente en la cepa de levadura vínica, *S. cerevisae* T₇₃ (CECT 1894).

10

3. Aplicación en la producción de vino de la levadura vínica, según reivindicaciones 1 y 2, **caracterizada** porque se realiza por el inóculo de cepas CECT 1973 recombinantes que expresen la proteína codificada que corresponde a la SEQ ID NO:2, o por el inóculo de otras cepas recombinantes que expresen enzimas capaces de degradar paredes celulares vegetales, preferentemente las β -(1,4)-endoglucanasas, de forma que contribuyen a aumentar entre dos el contenido de 2 fenil-etanol, butanol y alcohol isometílico hasta tres veces, como indicadores del aroma de los vinos.

15

4. Aplicación a la producción de vino de la levadura vínica, según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque la producción se efectúa por la adición al mosto de la proteína codificada según la reivindicación 3, parcial o totalmente purificada o por la adición de cualquier β -(1,4)-endoglucanasa, parcial o totalmente purificada.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

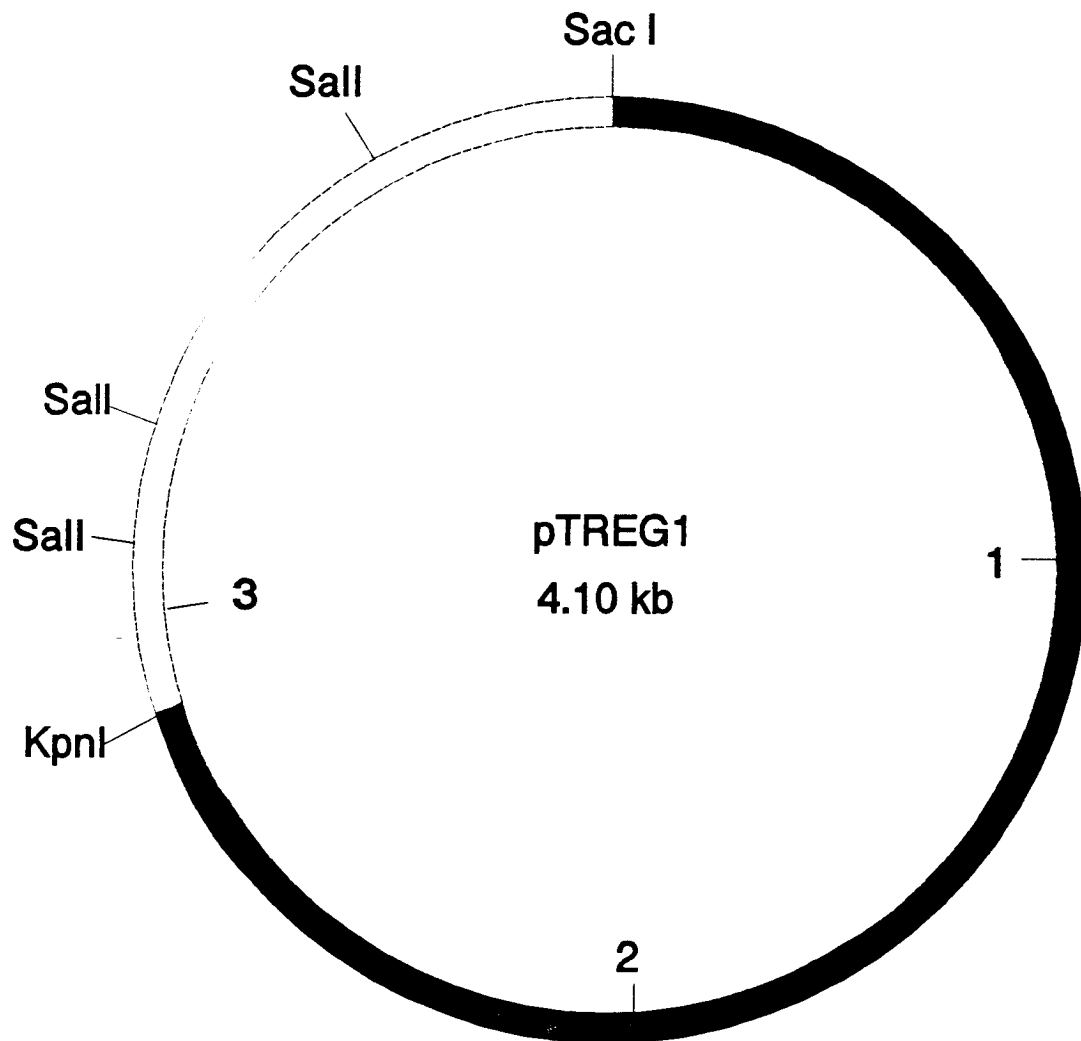


Figura 1

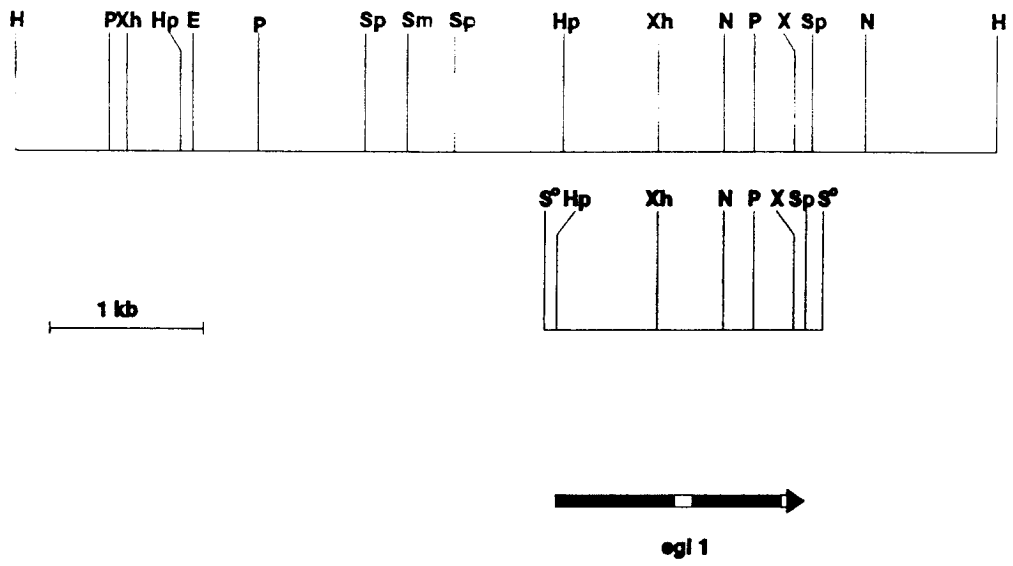


Figura 2

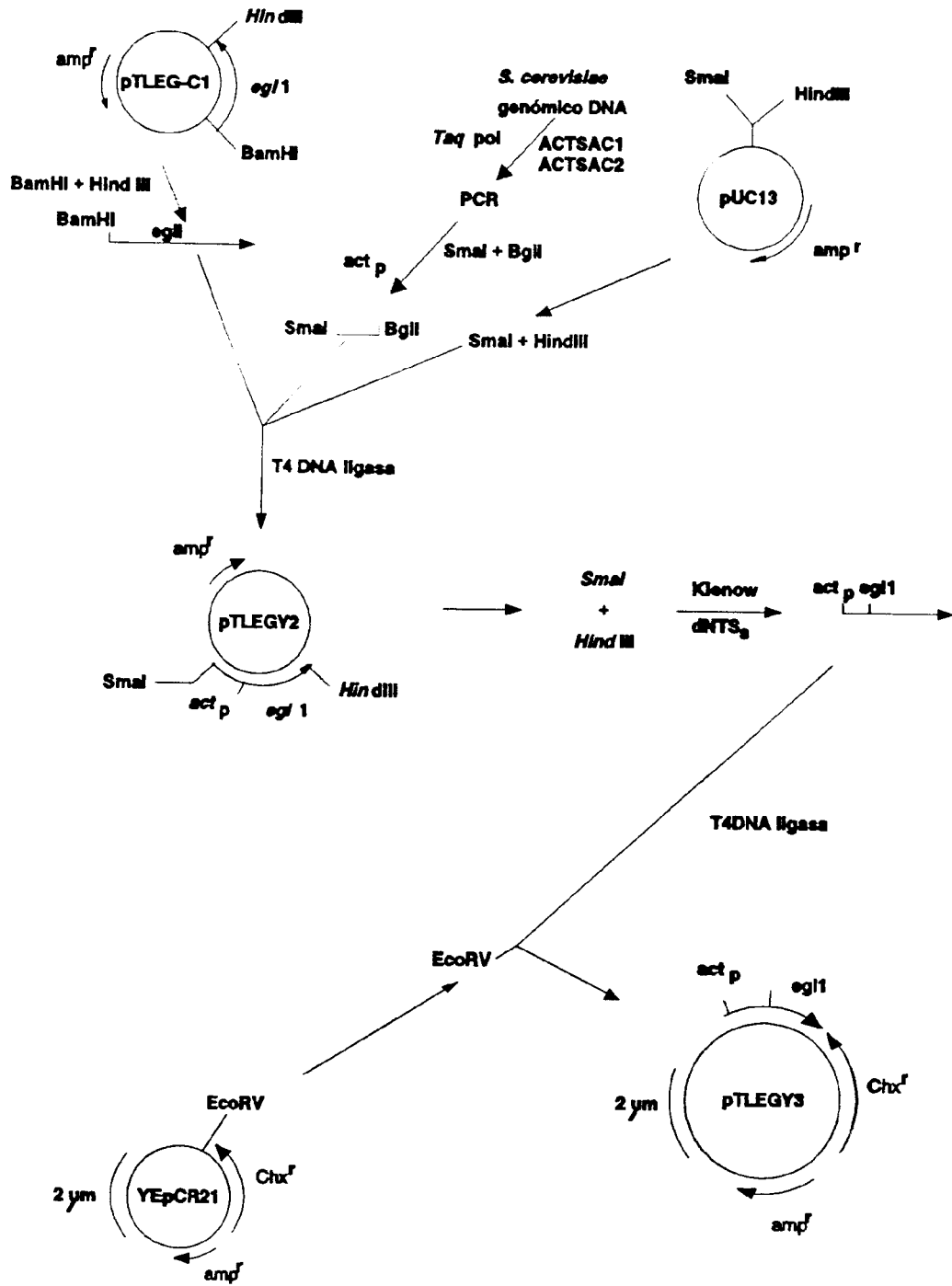


Figura 3

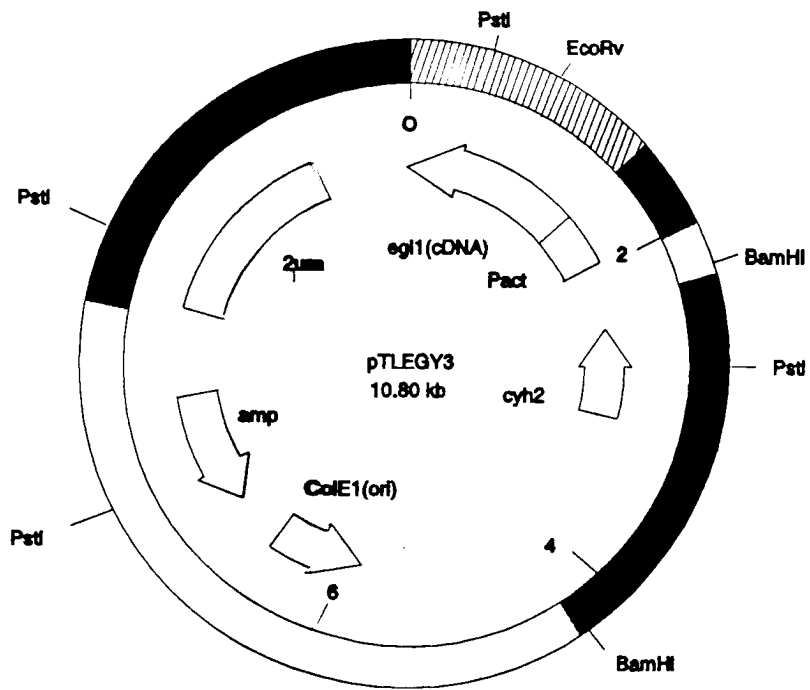


Figura 4



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁵: C12N 1/19, C12G 1/02, C12P 7/04 // (C12N 1/19, C12R 1:865)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	J. INST. BREW., Vol. 97, Marzo-Abril 1991; L. NAVAS et al.: "KAR1-Mediated transformation of brewing yeast", pág. 115-118 * Todo el documento *	1-4
A	CURR. GENET., Vol. 19, 1991; L. DEL POZO et al.: "Cycloheximide resistance as a yeast cloning marker", pág. 353-358 * Todo el documento *	1-4
A	APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL., Vol. 38, 1992; R. GONZALEZ et al.: "Cloning, sequence analysis and yeast expression of the egl1 gene from Trichoderma longibrachiatum" * Pág. 372, col. 2, figura 3 *	1-4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
26.07.94

Examinador
N. Urquía Fernández

Página
1/1