



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 223 231**

② Número de solicitud: 200201596

⑤ Int. Cl.7: **C12N 15/56**

C12N 15/76

C12N 1/19

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **08.07.2002**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2005**

Fecha de la concesión: **10.10.2005**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **01.11.2005**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.11.2005

⑰ Titular/es: **Universidad de Santiago de Compostela
Edificio CACTUS – CITT - Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

⑱ Inventor/es: **Vilanova de la Torre, Mar;
González Villa, Tomás y
Sieiro Vázquez, Carmen**

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Construcción de una cepa de levadura enológica de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante que sobreexpresa una endopoligalacturonasa.**

㉑ Resumen:

Construcción de una cepa de levadura enológica de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante que sobreexpresa una endopoligalacturonasa.

Construcción de una cepa de levadura enológica de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante para el gen PGU1, que sobreexpresa una endopoligalacturonasa. La cepa de levadura sintetiza y secreta una poligalacturonasa/pectinasa a concentraciones altas, para su utilización en la industria enológica. Mejora los procesos de clarificación y filtración de los vinos, sin modificar su aroma ni aumentar el nivel de metanol de los mismos.

ES 2 223 231 B1

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

ES 2 223 231 B1

DESCRIPCIÓN

Construcción de una cepa de levadura enológica de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante que sobreexpresa una endopoligalacturonasa.

Construcción de una cepa de levadura enológica de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante que sobreexpresa una endopoligalacturonasa, para ser utilizada en la elaboración de vinos.

El gen PGU1 es un gen que codifica para la producción de poligalacturonasas en levaduras. La sobreexpresión del gen PGU1 en la cepa de levadura silvestre MR-7 de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa seleccionada de la microbiota autóctona de la variedad de uva Albariño en Galicia) da lugar a una superproducción de poligalacturonasa que es secretada al sobrenadante de cultivo de la levadura. Estos enzimas, poligalacturonasas, son muy utilizados en la industria enológica para realizar el desfangado y la clarificación de mostos y vinos lo cual facilita las tareas de filtrado de los mismos, ya que degradan las sustancias pécticas.

Las sustancias pécticas son un grupo de polisacáridos complejos que aparecen en cantidad variable en todos los tejidos de plantas superiores. Se localizan en los espacios intercelulares formando parte de la lámina media, y por tanto, son los principales responsables de la integridad y coherencia de los tejidos de las plantas. Estos polímeros están constituidos por una cadena principal de unidades de ácido (1,4)- α -D-galacturónico parcialmente esterificadas con grupos metilo.

Los polisacáridos de la uva son el resultado de la degradación y solubilización de una parte de las sustancias pécticas de la pared de las células del hollejo y de la pulpa y estos pueden ser pectinas o gomas. Las pectinas son cadenas formadas casi exclusivamente por unidades de ácido galacturónico parcialmente esterificado por metanol. Las gomas son los residuos de la transformación de las sustancias pécticas del mosto, después de la acción de las pectinasas endógenas o exógenas (Dubourdieu y col., 1981. *Connaissance Vigne Vin*. 15: 29-40).

En el vino las sustancias pécticas suponen un problema ya que afectan a la clarificación, estabilización y filtración (Pilnik y Rombouts 1985. *Carbohydr. Res.* 142: 93-105). Las sustancias pécticas colmatan las capas filtrantes durante la filtración de los vinos. Por este motivo y para mejorar los problemas de filtración se utilizan los enzimas pectolíticos. Las sustancias pécticas son degradadas de forma natural por los enzimas pécticos. Los enzimas pécticos, pectinasas o enzimas pectolíticos se clasifican en pectinasas y enzimas depolimerizantes.

Pectinesterasas (PME), son los enzimas encargados de liberar los grupos metilo de la pectina, formando ácido péctico. Son producidos por las plantas superiores, numerosos hongos, bacterias y algunas levaduras (Sakai y col., 1993. *Science*. 230: 1350-1354).

Depolimerasas, rompen los enlaces α -(1,4) entre residuos de ácido galacturónico de las sustancias pécticas bien por hidrólisis (hidrolasas o poligalacturonasas) o por β -eliminación (liasas). Son producidos por numerosos hongos y bacterias, algunas levaduras y por plantas superiores. Las endopoligalacturonasas (endo-PG) que rompen el polímero en el interior de la cadena, dan lugar a una acusada reducción de la viscosidad, mientras que las exo-PG, que cortan en los extremos del polímero, producen una reducción mucho menor de la viscosidad.

Los enzimas pécticos son producidos por plantas y microorganismos, aunque también se ha descrito su presencia en insectos, nematodos y algunos protozoos. Son numerosas las revisiones sobre los enzimas pécticos (Reková-Benková y Markovic, 1976. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 33: 323-385; Fogarty W.M. y col., 1983. *Applied Science Publishers*; Rombouts F.M. y col., 1989. *Economic Microbiology*. 5: 227-282; Sakai T. y col., 1993. *Adv. Appl. Microbiol.* 39: 213-294).

Los enzimas producidos por hongos han sido estudiados especialmente en *Aspergillus*, porque este hongo se utiliza como fuente productora de poligalacturonasas a nivel industrial (Maldonado y col., 1994. *Curr. Microbiol.* 28: 193-196). Se han clonado varios genes que codifican para la producción de poligalacturonasas y pectin liasas, especialmente a partir de *Aspergillus niger* (Gysler y col., 1990. *Gene*. 89: 101-108; Ruttkowski y col., 1991; Bussink y col., 1991. *Mol. Microbiol.* 5,6: 1353-1361; Bussink y col., 1992. *Eur. J. Biochem.* 208:83-90; Ho y col., 1995. *Curr. Genet.* 27: 141-149; Cary y col., 1995. *Gene*. 153:129-133).

La síntesis de enzimas pécticos en levaduras no está tan extendida como en bacterias y hongos, y además, el espectro de enzimas producidas es más reducido. El enzima producido por las levaduras es casi siempre una poligalacturonasa (endo o exo).

Los primeros autores que estudiaron la presencia de enzimas pécticos en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* fueron Luh y Phaff (Luh B.S. y col., 1954. *Arch. Biochem. Biophys.* 33: 213-22). McKay (McKay 1990. *Letters of Applied Microbiology*. 11:41-44) publica la degradación de ácido poligalacturónico por dos cepas de *S. cerevisiae*. Gainvors y col., (1994) *Yeast* 10:1311-1319, encontraron la presencia de actividad poligalacturonasa, pectinesterasa y pectato liasa en una cepa de esta levadura; y Blanco y col., (1994). *Can. J. Microbiol.* 40: 974-977, caracterizaron la endo-PG de la cepa *S. cerevisiae* 1389.

ES 2 223 231 B1

Laing y Pretorius, (1993). J. Appl. Bacteriol. 75: 149-158 y Van Resburg y col., (1994). Curr. Genet. 27: 17-22, obtuvieron cepas recombinantes de *S. cerevisiae* expresando un gen de una pectato liasa de *Erwinia chrysanthemi* y un gen de una poligalacturonasa de *Erwinia carotovora* en levaduras de vino. González Candelas y col., (1995) FEMS Microbiol. Letters. 126: 263-270, construye una cepa recombinante de levadura de vino de la especie *S. cerevisiae*, expresando un gen que codifica para una pectin liasa de *Fusarium solani*.

Siekstele y col., (1999) Yeast. 15:311-322, realizan la clonación y expresión de un gen que codifica para una endopoligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus* (EPGU1), encontrando que la secuencia de aminoácidos mostraba gran similitud con poligalacturonasas de hongos.

En la industria enológica, durante la transformación del mosto en la vinificación, las sustancias pécticas son modificadas por la acción de pectinasas naturales de la uva o por enzimas industriales, añadidos durante la fermentación, para facilitar los procesos de clarificación y filtración.

Como ya se ha indicado anteriormente, los preparados comerciales de enzimas pécticos se obtienen fundamentalmente de *Aspergillus niger* y están constituidos por una mezcla de enzimas, que representan un espectro bastante amplio de actividades enzimáticas, alguna de las cuales se consideran desfavorables ya que dan lugar a características no deseadas en el vino. En este sentido, hay que tener en cuenta que la calidad y rendimiento son importantes puesto que, como demostraron Sims y col., (1988). Am. J. Enol. and Vitic. 39,4: 341-343 y Haight y Gump (1994). Am. J. Enol. and Vitic. 45,1: 113-116, cuando se utilizan preparados comerciales que contienen enzimas de diversos tipos, el rendimiento es mayor que en el caso de utilizar enzimas pécticos únicamente.

Williams y col., (1978) Am. J. Enol. and Vitic. 29:92-96, comprobaron que los vinos clarificados rápidamente eran claros y afrutados, mientras que los que estaban más tiempo en contacto con los residuos tenían malos aromas.

En el caso de vinificación en blanco, estos enzimas pueden dar lugar a una aumento de vinil-fenoles y como consecuencia una depreciación de la calidad aromática del vino. Esto es debido a que las pectinasas industriales, de *Aspergillus niger*, contienen actividad de tipo cinamil esterasa (CE) que catalizan la hidrólisis de los ésteres tártricos de los ácidos hidroxycinámicos del mosto durante la fase prefermentativa. Bajo la acción de la cinamato decarboxilasa de *S. cerevisiae*, los ácidos p-cumarico y ferúlico son transformados en vinil-fenoles (vinil-4-fenol y vinil-4-gaiacol) durante la fermentación alcohólica (Chatonnet y col., 1992. Revue Franraise d'Oenologie. 138: 21-24).

El uso de poligalacturonasas de levaduras no provoca el aumento en el contenido de metanol de los vinos. Se sabe que el contenido en metanol de los vinos obtenidos a partir de mostos extraídos con enzimas pécticos comerciales es mayor que el de vinos obtenidos en condiciones controladas en ausencia de estos enzimas (Bertrand y col., 1996. Revue Francaise d'Oenologie. 157: 28-30).

Este último dato es un factor a tener en cuenta, ya que durante la actuación de las pectinasas de *Aspergillus niger* se liberan estos grupos metilo al medio, los cuales influyen negativamente sobre las características organolépticas de los vinos obtenidos a partir de estos mostos.

Otros autores (Gainvors y col., 1994. Yeast 10: 1311-1319), manifiestan el interés enológico de una fuente pectinolítica natural, presente en las levaduras de vinificación, sin el riesgo que producen los preparados enzimáticos procedentes de *Aspergillus niger* y otros hongos. Delfini C., 1994. Assoc. Enol. Enotec. Ital. Sciacia., destaca la gran utilidad que tiene el disponer de una cepa de levadura con alta actividad pectolítica, ya que además ayudaría a extraer de la piel de la uva las moléculas precursoras del aroma que se incorporarían al proceso normal de la fermentación.

Belarbi y Lemaesquier, 1994. Assoc. Enol. Enotec. Ital. Sciacia, evidenciaron la efectividad de la cepa C94 de *S. cerevisiae* en la clarificación de los vinos, atribuyéndola a la actividad pectolítica que disminuía la viscosidad del mosto.

En este sentido Gainvors y col., 1994. Yeast 10: 1311-1319, demuestra que añadir al mosto un extracto enzimático de *S. cerevisiae* (SCPP 2180) con actividad pectinesterasa, pectinliasa y poligalacturonasa tiene el mismo efecto sobre la turbidez que la misma cantidad de la preparación comercial Endozyme (Pascal Biotech SARL-Paris). Blanco y col., 1997. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, demuestran también que en la fermentación del vino, llevada a cabo con cepas de levadura de *S. cerevisiae* poligalacturonasa +, el proceso de clarificación es mas fácil y el tiempo de filtración se reduce en un 50% en algunos casos.

La presencia de poligalacturonasas en cepas de *S. cerevisiae* también fue descrita en un 75% de las cepas de *S. cerevisiae* aisladas en fermentaciones espontáneas de mostos del NW de España.

Debido a los problemas que supone la utilización de enzimas pectolíticos comerciales en la elaboración de los vinos, la presente invención propone el uso en la fermentación alcohólica de los mostos, de una levadura modificada genéticamente, que produzca grandes cantidades de enzima, para conseguir los mismos efectos que los enzimas comerciales, a nivel de clarificación y filtración de los vinos, pero sin los problemas que estos enzimas conllevan a nivel aromático de los vinos y de producción de metanol.

Las cepas y plásmidos utilizados están descritos en la Tabla 1.

ES 2 223 231 B1

TABLA 1

Cepas y plásmidos utilizados en este estudio

	Cepa/plásmido	Características relevantes	Referencia
5	Cepas <i>S. cerevisiae</i>		
	MR-7	Cepa enológica seleccionada	Este estudio
10	USC1	Cepa transformada con el gen PGU1	Este estudio
	Bacterias		
	Escherichia coli DH5 α		Hanahan (1983)
	Plásmidos		
15	pBSK ⁺ - PGU1	4,05 Kb. Amp ^R , β -GAL	Blanco (1997)
	pBEJ16 - PGU1	10,09 Kb. Amp ^R LEU2, pPGK	Blanco (1997)

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de levaduras y bacterias se describen a continuación:

20

Medios para levaduras

Medio YEPD

25

Extracto de levadura (1%), peptona (2%), glucosa (2%).

Para medio sólido se añade agar bacteriológico al 2%.

30

Para seleccionar las cepas transformantes de levadura se utilizó como medio YEPD + geneticina (G418) (Handfield y col., 1990. Curr. Genet. 18: 303-313).

Medio YNB para la detección de la actividad pectolítica

35

En placa: ácido poligalacturónico (0.5%), sacarosa (0.5%), YNB w/o aminoácidos (0.7%), aminoácidos necesarios en cada caso y agar bacteriológico al 2%. El poligalacturónico se disuelve en agua destilada hirviendo, se añaden los demás componentes y finalmente se ajusta el pH a 8.0.

Medios para bacterias

40

Medio LB para crecimiento y mantenimiento

Contiene triptona (1%), extracto de levadura (0.5%), cloruro sódico (1%) y agar bacteriológico al 2%. Cuando fue necesario el medio se suplementó con ampicilina a una concentración final de 60 μ g/mL.

45

Procedimiento de construcción de la cepa USC-1

50

El proceso que se describe a continuación comienza con la selección de levaduras silvestres que posean actividad poligalacturonasa, ya que esta actividad es la que queremos incrementar en dicha cepa, de forma que al producir vino con ella logremos los mismo efectos que los enzimas comerciales. A continuación se describe paso a paso el proceso realizado.

Selección de levadura silvestre MR-7

55

En primer lugar se seleccionaron levaduras silvestres y se comprobó si poseían genotipo poligalacturonasa +. Esta comprobación se realiza mediante PCR y mediante hibridación ADN-ADN (Southern E.M. 1975. J. Mol. Biol. 98: 503-517). Se comprueba que todas las cepas silvestres de *S. cerevisiae* analizadas portan el gen PGU1 (gen que codifica para la producción de poligalacturonasa). Posteriormente se mide la actividad poligalacturonasa en placa y en medio líquido comprobándose que no todas tienen actividad, lo que nos indica que algunas cepas de levadura portan el gen pero no es activo.

60

Teniendo en cuenta que hay cepas con y sin actividad poligalacturonasa, nos interesa una cepa que sea poligalacturonasa positiva, es decir que produzca el enzima, para así manipularla de forma que incrementemos la cantidad de enzima producido. Para ello se realizó la construcción de una levadura enológica de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, con la finalidad de sobreexpresar una endopoligalacturonasa, para ser utilizada en la elaboración de vino. Esto se llevó a cabo con una cepa silvestre poligalacturonasa + denominada *S. cerevisiae* MR-7.

65

ES 2 223 231 B1

Manipulación de ácidos nucleicos

La manipulación del DNA (tratamiento con enzimas de restricción, ligaciones, transformación de *E. coli*, cuantificación de DNA y aislamiento de plásmidos se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Sambrook y col. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual (2ª ed). Para la recuperación de DNA a partir de geles de agarosa se utilizó el kit de Biorad. El aislamiento de ADN plasmídico de bacterias se realiza utilizando un kit comercial de Promega (Wizard[®] Plus Midipreps-DNA Purification System). El aislamiento de ADN genómico de *S. cerevisiae* se llevó a cabo según el protocolo descrito por Struhl, con ligeras modificaciones (Struhl y col., 1979. Proc. Natl. Acad.Sci.USA. 76:1035-1039). El aislamiento de ADN genómico de *S. cerevisiae* se llevó a cabo según el protocolo descrito por Struhl, con ligeras modificaciones (Struhl y col., 1979. Proc. Natl. Acad.Sci.USA. 76:1035-1039).

Hibridación ADN-ADN (Southern-Blot)

La detección de secuencias de ADN específicas se realizó siguiendo la técnica descrita por Southern (Southern E.M. 1975. J. Mol. Biol.. 98: 503-517). El ADN genómico (digerido totalmente con el enzima *Hind* III) se hibridó con una sonda de ADN marcada con un kit no radiactivo (DIG High DNA Labeling and Detection Starter Kit II) de Boehringer Mannheim.

Reaccion de polimerización en cadena (PCR)

Para la detección del gen PGU1 en las cepas, se llevó a cabo la PCR utilizando DNA polimerasa (Promega). La mezcla de reacción contenía 1 µL de cada dNTP (5 mM), 1 µL de cada oligonucleótido (PG-1 y PG-2), 10 µL (4x10⁶ células/mL), 10 µL del tampón 10X de la Taq DNA Polimerasa, 3.5 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL de Taq ADN Polimerasa (Promega). Se completó el volumen con agua mili-Q estéril. El volumen final de la reacción fue de 100 µL.

PG1 (5'CGCGGATCCATGATTTCTGCTAATTCATTACTTATTT3')

PG1r (5'CGCGGATCCTTAACAGCTTGCACCAGATCCAG3')

Las condiciones de amplificación fueron:

- 1 ciclo a 94°C, 2 min para la desnaturalización,

- 30 ciclos a 94°C 30 s, 55°C 30 s, y 72°C 30 s para la amplificación, y

- 1 ciclo a 72 °C, 5 min para finalizar la reacción.

Detección de la actividad pectolítica

Para la detección en placa de cepas productoras de enzimas pécticos se utilizó un medio YNB. Las placas se incubaron 5 días a 30°C y la producción de enzimas pécticas se detectó añadiendo CIH 6N sobre la placa como describen Blanco y col., (1994). Cuando la cepa es productora de enzimas que degradan la pectina, aparece un halo de hidrólisis alrededor de la colonia, fácilmente reconocible frente al medio opaco.

La actividad poligalacturonasa fue determinada en medio líquido según el método de Somogyi (Somogyi M. 1952. J. Biol.. Chem. 159:19-23) modificado por Nelson (Nelson N.J. 1957. Academic Press. New York. 3:85-86). La mezcla de ensayo, que contenía 500 p.L de muestra (sobrenadante concentrado y dializado) y 500 µL de sustrato (PGA al 0.5% disuelto en tampón acético-acetato 50 mM, pH 5.5) se incubó, a 37°C, durante un periodo de tiempo variable según las muestras.

El contenido de proteína de las muestras fue determinado siguiendo el método de Lowry (Lowry y col., 1951. J. Biol.. Chem. 193: 265-275), utilizando seroalbúmina bovina (BSA) como patrón de concentración conocida.

Construcción de la cepa USC-1

Para la construcción de la cepa que produzca una gran cantidad de enzima, hay que aumentar el número de copias del gen que codifica para la producción del enzima en cuestión (gen PGU1) en la levadura silvestre, es decir la sobreexpresión de dicho gen.

Sobreexpresión del gen PGU1 de Saccharomyces cerevisiae en la levadura silvestre MR-7

El plásmido pBEJ16-PGU1 fue utilizado para la transformación de *S. cerevisiae* MR-7 y esta se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Ito y col. (Ito y col., 1983. J. Bacteriol. 153: 163-168). Para ello, las células se crecieron en YEPD hasta que la absorbancia, a 600 nm, estuviera comprendida entre 0.7-0.9. Se centrifugaron 10 mL del cultivo y las células se lavaron 2 veces con agua estéril, se resuspendieron en 1 mL de acetato de litio 0.1 M en TE y se incubaron a 30°C con agitación suave durante 1-2 horas.

ES 2 223 231 B1

A continuación, se hicieron alícuotas de 100 μL a las que se añadieron 40 μg de "ADN carrier" (ADN de esperma de salmón hervido 15 min) y 1-2 μg de DNA transformante y la mezcla se incubó durante 30 min a 30°C, tras lo cual se añadieron 0.7 mL de PEG-4000 al 40% en acetato de litio 0.1 M y se incubó de nuevo a 30 °C 30 min. Seguidamente, las células se sometieron a choque térmico 5 min a 42°C y, después de lavarlas dos veces con TE, se sembraron por extensión en placas con el medio selectivo adecuado.

En la Figura 1 se representa la ligación y transferencia de *E. Coli*.

En la Figura 2 se representa la recuperación del plásmido con el gen PGU1.

La cepa recombinante (USC-1), depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de orden CECT 11777, mostró una gran actividad pectolítica (520 U/mL) en medio líquido con respecto a la cepa silvestre MR-7 (142 U/ml). La actividad poligalacturonasa fue determinada en el sobrenadante, dializado en tampón acético-acetato durante 24 horas, mediante Somogy-Nelson.

La diferencia de actividad entre ambas cepas demostró la sobreexpresión del gen PGU1 en la cepa USC-1, ya que la producción de enzima es mucho mayor que la cepa parental, lo que pone de manifiesto la correcta transformación.

A continuación se intenta demostrar que la nueva cepa (USC-1) produce los efectos esperados en la vinificación, para lo cual se realizan vinificaciones y se comparan los resultados de las mismas con los resultados obtenidos cuando se utilizan enzimas comerciales.

Ensayos de vinificación con la cepa recombinante USC1 en comparación con la utilización de enzimas pectolíticos

Los ensayos de vinificación se realizaron en recipientes de vidrio de 10 litros. Estos recipientes se llenaron con mosto estéril de la variedad Albariño variedad blanca autóctona de Galicia). Se prepararon los preinóculos con las cepas a estudiar en mosto de Albariño y se incubaron 24 horas a 30°C con 160 rpm. Posteriormente se inocularon , adicionando el volumen adecuado de estos cultivos, hasta obtener una densidad celular de 10⁶ cel/mL. Las fermentaciones se realizan a una temperatura de 18°C.

En los casos donde fue necesario se utilizaron también dos enzimas de la empresa Novo Nordisk: A (Novoclair FCE G) que es un preparado enzimático pectolítico purificado procedente de *Aspergillus niger*, especialmente seleccionado para la clarificación de mostos blancos por su actividad pectin metil-esterasa; y B (Vinozym FCE G) que también procede de *Aspergillus niger* y contiene actividades pectolíticas y actividades secundarias como hemicelulasas y celulasas. A se utilizó en una dosis de 1 g/hL y B en 3 g/hL.

*Control de implantación de *S. cerevisiae* en fermentaciones*

Para comprobar la dominancia de la cepa inoculada sobre la microbiota del mosto en las distintas fases de la fermentación, se extrajeron muestras cada 24 horas y se sembraron en medio YEPD para *S. cerevisiae* MR-7 y en YEPD+geneticina (0.5 mg/mL) para la cepa USC-1. Posteriormente, se realizaron estudios de PCR y Electroforesis en Campo Pulsante de 20 colonias al azar, para comparar los perfiles y cariotipos de las cepas encontradas con los de las cepas inoculadas. Los resultados ponen de manifiesto la dominancia de la cepa USC-1, frente a la microbiota propia del mosto.

La PCR para ver la implantación de las cepas se realizó a partir de células enteras de *S. cerevisiae* siguiendo el método de Bellis y col., (Bellis y col., 1987. Nucleic. Acids. Research. 15, 16:6749). Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados por Ness y col., (Ness y col., 1992. J. Sci. Food Agric. 62: 89-94):

delta 1 (5'CAAAATTCACCTATA/TTCTCA3')

delta 2 (5'GTGGATTTTTATTCCAACA3')

La reacción se realizó en un volumen final de 100 μL conteniendo: 10 μL (4 x10⁶ células/mL), 10 μL de tampón 10X de la Taq DNA polimerasa Promega), 1 μM de cada oligonucleótido, 200 μM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2.5 unidades de Taq DNA polimerasa (Promega). Los ciclos de amplificación fueron realizados en un equipo Bio-Rad Gene Cycler. La amplificación se desarrolla de la manera siguiente:

- 4 ciclos: desnaturalización 95°C durante 30 s, hibridación 45°C durante 30 s, síntesis 72°C durante 2 min.

- 30 ciclos: desnaturalización 95°C durante 30 s, hibridación 42°C durante 30 s, síntesis: 72°C durante 2 min.

La Electroforesis en Campo Pulsante para comprobar la implantación de las cepas

Las cepas de levaduras se prepararon según el método de Bellis y col., (Bellis y col., 1987. Nucleic. Acids. Research. 15, 16:6749). Las levaduras (50 μL) se crecieron en 150 mL de YEPD estéril durante una noche a 30°C y con agitación (100 rpm). Al día siguiente se recogieron por centrifugación (10 min a 3000 rpm), se lavaron dos veces en una disolución de EDTA 0.05 M, pH 8.5 y se resuspendieron en 2 mL de EDTA 0.05 M. A continuación se mezcló 1

ES 2 223 231 B1

mL de esta solución con 1 mL de agarosa 1% en EDTA 0.05 M y se colocó en pequeños moldes dando lugar a unos bloques.

Después de su solidificación, los bloques se incubaron en un tampón de lisis, durante 6 horas a 37°C, para destruir las paredes celulares de las levaduras (NaCl 0.5 M, EDTA 0.25 M, Tris HCl 0.125 M, pH 7.5, (β -mercaptoetanol 0.5 M). Posteriormente el tampón de lisis se sustituyó por otra solución durante 36 horas a 42°C para destruir las proteínas celulares (Pronasa E de *Streptomyces griseus* 1 mg/mL, sarcosyl 1%, EDTA 0.45 M). Los bloques se lavaron tres veces durante 30 min en tampón TE a 50°C (Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM), y otras tres veces durante 30 min en el mismo tampón a temperatura ambiente. Los cromosomas de la levadura se separan según su tamaño por electroforesis en gel de agarosa. La agarosa se preparó a una concentración de 0.8% en tampón 1X TBE (Tris base 50 mM, ácido bórico 50 mM y EDTA 1 mM, pH=8).

La técnica empleada se llama CHEF (Countour Clamped Homogeneous Electric Field), que utiliza campos eléctricos alternativos homogéneos orientados a 120°C. Se utilizó un aparato de la marca Pharmacia realizando la migración a voltaje constante (165 V) y a una temperatura de 10°C. Las condiciones de electroforesis son las siguientes: pulsadas de 90 s durante 20 h, pulsadas 100 s durante 12 h, pulsadas 120 s durante 12 h, pulsadas 30 s durante 4 h. Los cromosomas de levadura utilizados como marcadores de tamaño provienen de una cepa de *S. cerevisiae* (YNN 295).

Actividad enzimática y tiempos de filtración del vino elaborado

Como ya se dijo anteriormente; la finalidad del uso de enzimas comerciales durante la fermentación alcohólica de los mostos para producir vino, es provocar una buena clarificación, lo que conlleva a una rápida y económica filtración de dichos vinos. Por ello se realizó la medida de actividad enzimática en los vinos elaborados y se midieron los tiempos de filtración, para así poder comparar nuestra cepa con los enzimas comerciales.

La medida de la actividad enzimática en el vino elaborado con USC-1 muestra un valor elevado si lo comparamos con la cepa silvestre MR-7, como era de esperar

Si comparamos el valor de actividad en el vino elaborado con la cepa USC-1 respecto a las fermentaciones suplementadas con enzimas pectolíticas, se pudo apreciar que los dos últimos casos (Enzimas A y B) la actividad es mayor. Sin embargo, si comparamos los tiempos de filtración de los vinos elaborados, observamos diferencias muy significativas, descritas en la Tabla 2.

TABLA 2

Efecto de la actividad pectolítica en los tiempos de filtración de los vinos

Fermentación	Tiempo de Filtración (s) ^a	Actividad enzimática máxima del vino (U/ml)
MR-7	> 500	10
USC-1	30	205
USC-1+A	20	1236
USC-1+B	20	720

^a El volumen filtrado fue 100 ml a través de membranas Millipore de 0.45 μ m de tamaño de poro.

Según lo expuesto, la adición de enzimas pectolíticos comerciales no sería necesaria en fermentaciones llevadas a cabo con la cepa USC-1 o con cualquier otra cepa seleccionada portando el mencionado gen PGU1 en sobreexpresión plasmídica.

Una vez demostrado lo que se pretendía desde el principio, se estudiaron otras facetas en los vinos para ver si con la cepa USC-1 se evitaban los efectos perjudiciales de los enzimas comerciales. Para ello, se estudió la producción de metanol y de compuestos aromáticos durante la fermentación, ya que los enzimas comerciales dan lugar a contenidos elevados en metanol (alcohol tóxico) y dan lugar también a cambios en los aromas típicos de la variedad de uva, tan valorados en los vinos protegidos con denominación de origen.

Metanol y compuestos aromáticos de los vinos elaborados

Como fase final, se estudió la producción de metanol y se hizo un estudio del perfil aromático de los vinos elaborados con la cepa silvestre MR-7 de *Saccharomyces cerevisiae*, con la recombinante USC-1 y con enzimas pectolíticos comerciales (A y B). Se realiza un análisis químico por cromatografía en fase gaseosa y análisis organoléptico de los vinos elaborados. En cuanto al metanol las diferencias fueron importantes, ya que la cantidad de metanol se duplicaba cuando se utilizaban enzimas pectolíticos comerciales.

ES 2 223 231 B1

Con respecto al perfil aromático de los vinos, realizado por un comité de catadores profesionales, se observó que el vino elaborado con la cepa USC-1 presentaba los aromas más típicos de la variedad de uva, en este caso el aroma a manzana considerado el aroma de la variedad de uva albariño.

- 5 Cuando se realizó cromatografía de gases para el estudio aromático, se comprobó que la mayor concentración de terpenos se encontraba en los vinos elaborados con las cepas MR-7 (silvestre) y USC-1 (recombinante para el gen PGU1), concretamente el linalol y el citronelol, compuestos considerados más importantes en la variedad de uva albariño, corroborándose así la tipicidad.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de construcción de una cepa de levadura enológica de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante que sobreexpresa una endopoligalacturonasa mediante expresión del plásmido pBEJ16-PGU1, **caracterizado** por:

a) Transformación de la levadura con el plásmido pBEJ16-PGU1.

b) Expresión del plásmido pBEJ16-PGU1 en dicha levadura.

10 2. Cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae*, USC-1, según la reivindicación 1, para el gen PGU1, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de orden CECT 11777.

15 3. Uso de la cepa recombinante USC-1, según las reivindicaciones anteriores, para la industria enológica.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

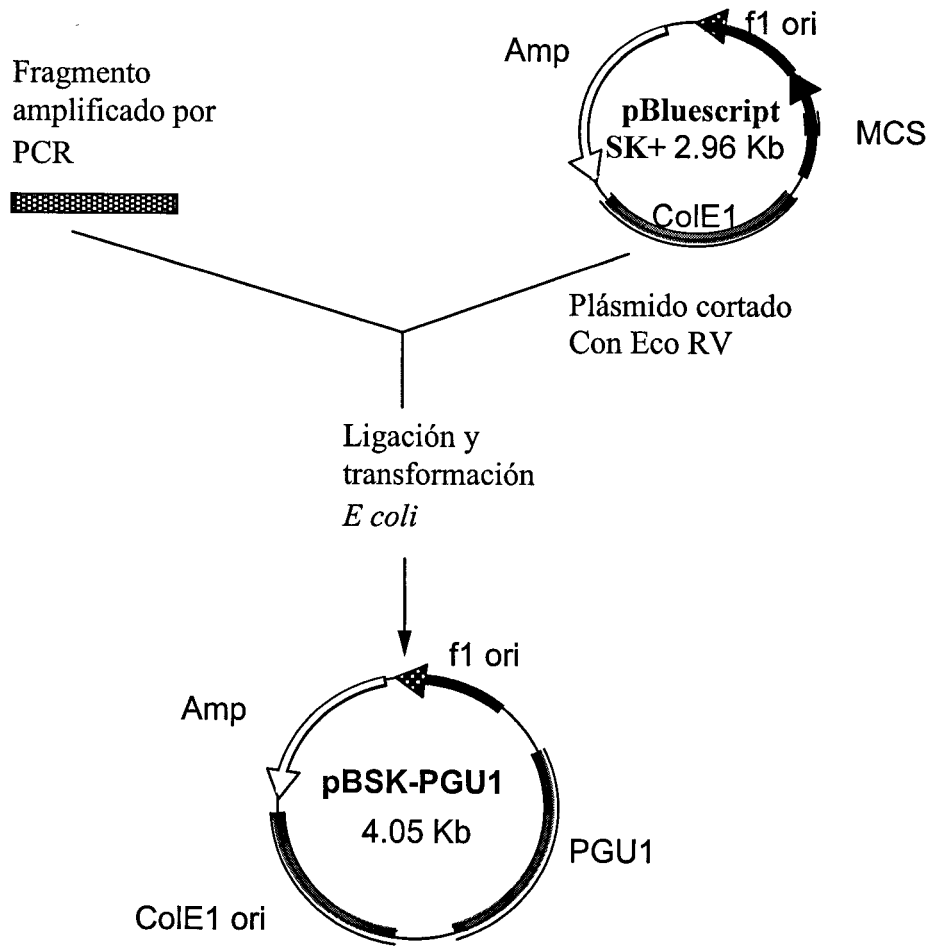


FIGURA 1

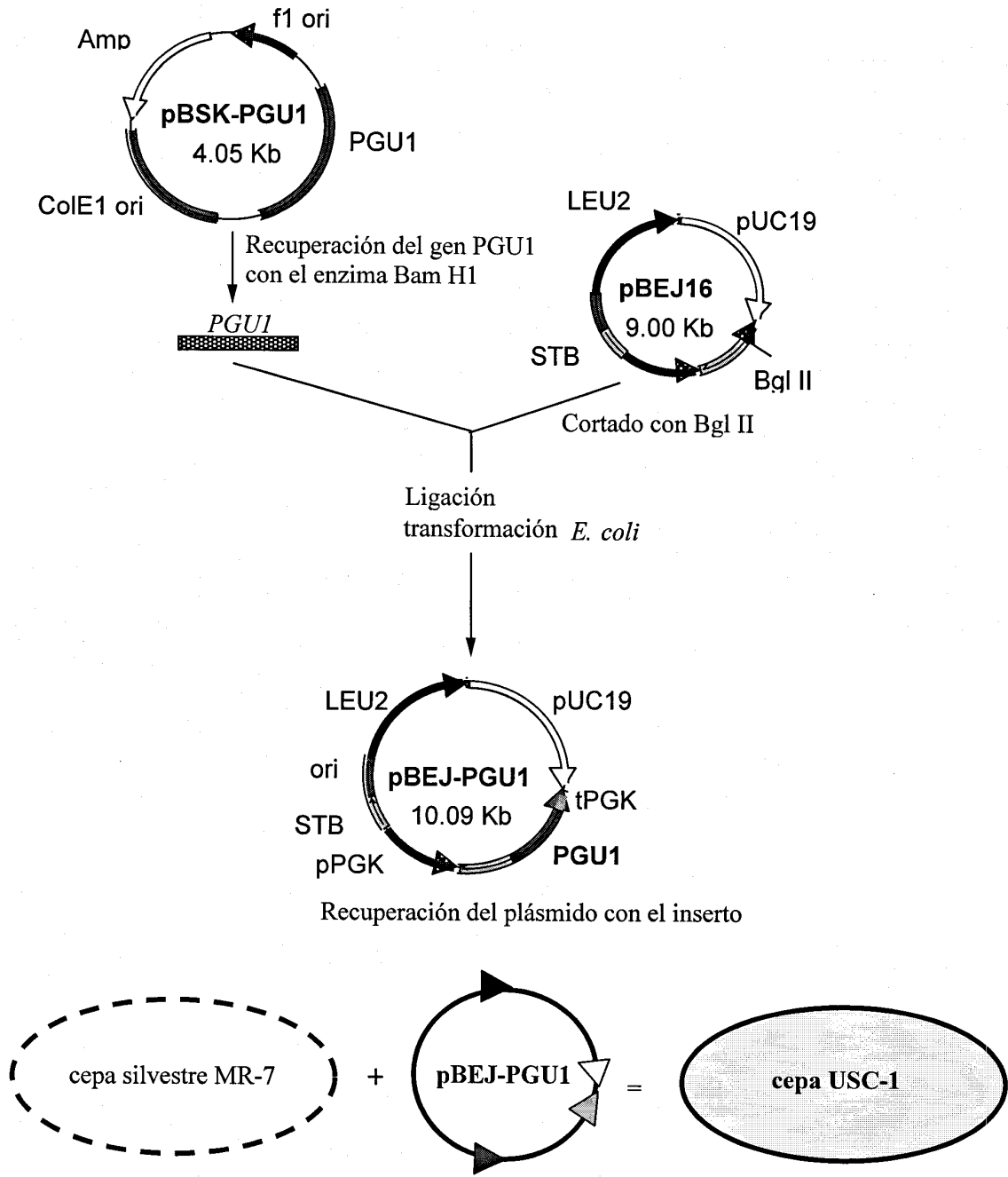


FIGURA 2

ES 2 223 231 B1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Universidad de Santiago de Compostela
- 5 <120> Construcción de una cepa de levadura enológica de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante que sobreexpresa una endopoligalacturonasa
- <130> M20PGU1
- 10 <140> P200201596
- <141> 2003-08-14
- 15 <210> 1
- <211> 37
- 20 <212> DNA
- <213> *Saccharomyces cerevisiae*
- 25 <400> 1
cgcgatcca tgattctgc taattcatta cttatt
- 30 <210> 2
- <211> 32
- <212> DNA
- 35 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
- <400> 2
cgcgatcct taacagcttg caccagatcc ag
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 223 231

② Nº de solicitud: 200201596

③ Fecha de presentación de la solicitud: **08.07.2002**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 15/56, 15/76, 1/19

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	VILANOVA, M. et al. "Use of a PGU1 recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain in oenological fermentations". JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, 2000, Vol. 89, páginas 876-883. Ver todo el documento.	1-3
X	BLANCO, P. et al. "Cloning, molecular characterization and expression of an endo-polygalacturonase-encoding gene from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IM1-8b". FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 1998, Vol. 164, páginas 249-255. Ver todo el documento.	1-3
X	GOGNIES, S. et al. "Cloning, sequence analysis and overexpression of a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> endopolygalacturonase-encoding gene (PGL1)". YEAST, 1999, Vol. 15, páginas 11-22. Ver todo el documento.	1
X	JIANHUA JIA et al. "Endopolygalacturonase genes and enzymes from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and <i>Kluyveromyces marxianus</i> ". CURR. GENET., 2000, Vol. 38, páginas 264-270. Ver todo el documento.	1
X	BLANCO, P. et al. "Production of pectic enzymes in yeasts". FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 1999, Vol. 175, páginas 1-9. Ver todo el documento.	1

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 nº:

Fecha de realización del informe 17.01.2005	Examinador J.L. Vizán Arroyo	Página 1/1
---	--	----------------------