



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 324 508**

② Número de solicitud: 200603283

⑤ Int. Cl.:

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

C12G 1/022 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **27.12.2006**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **07.08.2009**

Fecha de la concesión: **12.05.2010**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **31.05.2010**

⑥ Fecha de publicación del folleto de la patente:
31.05.2010

⑦ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑧ Inventor/es: **Orejas Suárez, Margarita;
Herrero Madrid, Óscar y
Ramón Vidal, Daniel**

⑨ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑩ Título: **Mejora del contenido aromático de vinos y otras bebidas alcohólicas mediante la utilización de microorganismos que, durante la fermentación, producen monoterpeno sintasas.**

⑪ Resumen:

Mejora del contenido aromático de vinos y otras bebidas alcohólicas mediante la utilización de microorganismos que, durante la fermentación, producen monoterpeno sintasas.

La presente invención describe un nuevo procedimiento para elaborar bebidas alcohólicas con mayor y/o diferente contenido terpénico, mediante la utilización de microorganismos manipulados genéticamente para que expresen durante la fermentación genes que codifican monoterpeno sintasas (a veces llamadas monoterpeno ciclasas), lo que les capacita para producir de novo monoterpenos aromáticos a partir de cualquier material vegetal de partida. Los microorganismos son transformados con el gen Lis, que codifica una linalol sintasa, incrementándose la secreción de linalol, como ejemplo de una familia extensa de genes que codifican monoterpeno sintasas.

Aunque los microorganismos serán preferentemente levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, también sería aplicable a otros microorganismos de interés enológico tales como otras levaduras y ciertas bacterias. En particular, bebidas alcohólicas fermentadas tales como vinos, incluidos cava y champagne, cerveza, sidra, sake, etc. podrán tener un aroma más favorable o diferente.

ES 2 324 508 B1

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

DESCRIPCIÓN

Mejora del contenido aromático de vinos y otras bebidas alcohólicas mediante la utilización de microorganismos que, durante la fermentación, producen monoterpeno sintetas.

5

Sector de la técnica

Sector vitivinícola. Se trata de dar solución al problema de los vinos (y eventualmente otras bebidas alcohólicas obtenidas por fermentación) con bajo contenido terpénico.

10

Estado de la técnica

El aroma de los vinos es una de las características más importantes en la valoración de su calidad. Se puede dividir en tres grandes grupos: (i) los aromas procedentes de la variedad de la uva o aromas primarios, producidos por sustancias volátiles, transferidas por los granos de la uva al mosto, fundamentalmente monoterpenos, que se pierden en gran parte durante el proceso; (ii) los aromas producidos durante la fermentación o aromas secundarios, entre los que se incluyen dos tipos de compuestos aromáticos mayoritarios, alcoholes superiores y ésteres; y (iii) el "bouquet", también conocido como aroma terciario, producido por la transformación final de los anteriores durante el envejecimiento.

15

El papel que juegan los monoterpenos - grupo muy variado de compuestos volátiles de bajo peso molecular - en el aroma afrutado y floral está bien definido (Williams *et al.*, 1980) y variaciones cualitativas y cuantitativas en los mismos son responsables de matices varietales característicos (Marais, 1983). Más recientemente se ha establecido que algunos monoterpenos pueden además ser considerados como nutracéuticos (Crowell, 1999; Wise y Croteau, 1999; Croteau *et al.*, 2000), por lo que la presencia de éstos podría ocasionar no sólo mejoras en las características organolépticas de los vinos sino también en sus características funcionales.

20

25

Los monoterpenos más abundantes en algunas variedades de uvas, y que en gran medida contribuyen al carácter varietal de los vinos, son linalol, geraniol, nerol α -terpineol y citronelol (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975; Park *et al.*, 1991). Éstos están presentes en dos fracciones distintas: una libre que contribuye al aroma, y otra ligada, formando diglicósidos no aromáticos, fundamentalmente 6-*O*- α -L-arabinofuranosil- β -D-glucopiranosidos, 6-*O*- α -L-arabinopiranosil- β -D-glucopiranosidos, 6-*O*- α -L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranosidos, 6-*O*- β -D-xilopiranosil- β -D-glucopiranosidos, 6-*O*- α -L-apiofuranosil- β -D-glucopiranosidos y 6-*O*- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranosidos, estando el aglicón siempre ligado a la β -D-glucopiranosil (revisado en Günata, 2003). Esta segunda fracción es cuantitativamente superior a la primera (Günata *et al.*, 1985a; 1985b), y apenas sufre cambios durante el proceso de fermentación llevado a cabo por *Saccharomyces cerevisiae*; por tanto supone una fuente potencialmente aprovechable para incrementar el aroma de los vinos. Se ha demostrado que la hidrólisis enzimática de estos compuestos precursores ocurre en dos etapas, en la primera la unión entre azúcares se rompe por la acción de una exoglicosidasa: una arabinofuranosidasa, una ramnosidasa, una β -xilosidasa o una apiosidasa y posteriormente, mediante la acción de una β -glucosidasa se libera el aglicón (normalmente un monoterpeno o un alcohol superior en menor medida) con capacidad aromática (Günata *et al.*, 1988; 1990). Más recientemente se ha mostrado que la acción única de una exoglucanasa, al actuar como una endoglicosidasa, es suficiente para la liberación del monoterpeno (Gil *et al.*, 2005).

30

35

40

Hasta ahora el uso de enzimas de maceración, que facilitan la liberación de los precursores glicosídicos, y de glicosidasas, que facilitan la liberación del aglicón, tanto adicionadas al vino como producidas por la propia levadura que lleva a cabo la fermentación (revisado por Günata, 2003; Manzanares y Orejas, 2005; Ramón *et al.*, 2005; Schuller y Casal, 2005; Verstrepén *et al.*, 2006; así como protegido por varias patentes: Günata *et al.*, 1989; Ramón *et al.*, 1994; Rosi y Paolo 1996; Fowler *et al.*, 1999; Vilanova de la Torre *et al.*, 2004) es una de las estrategias ya descritas para incrementar el aroma del vino. No obstante, con esta estrategia sólo sería posible aumentar los componentes aromáticos de aquellos vinos procedentes de variedades de uva que tienen un nivel elevado de terpenos glicosilados, por ejemplo Moscatel; sin embargo la mayor parte de las variedades que se usan en vinificación, por ejemplo Palomino, Xarel.lo, Bobal etc., tienen un perfil aromático más neutro debido a la escasez de terpenos tanto en forma libre como glicosilada (López-Tamames *et al.*, 1997; Gil y Vallés 2001; Estévez *et al.*, 2004).

45

50

En estos casos, una alternativa a la adición de enzimas o la utilización de levaduras recombinantes que expresan dichas actividades, sería que la propia levadura que lleva a cabo la fermentación fuese capaz de sintetizar de *novo* monoterpenos como consecuencia de su metabolismo. En este sentido, aunque *S. cerevisiae* normalmente no produce monoterpenos de forma natural, en un intento de obtener levaduras que los produjeran, se aislaron (tras mutagénesis con luz UV de la cepa de laboratorio FL100) dos mutantes autotróficos para ergosterol, de genotipo complicado, bloqueados en la enzima farnesil difosfato sintetasa, codificada por ERG20, y que además llevan mutaciones adicionales en otros genes de la ruta (*erg12-2* y/o *erg9*, codifican mevalonato kinasa y escualeno sintasa respectivamente) que les permitían reducir los niveles de geraniol para sobrevivir; el mutante VL134 era capaz de excretar farnesol (0.220 mg/L) y geraniol (0.450 mg/L), producidos desde sus formas fosforiladas posiblemente por fosfatasa inespecíficas (Chambon *et al.*, 1990a; 1990b). La habilidad de producir terpenos fue introducida en la cepa vínica L116 (Fermivin) por cruzamientos, y los mutantes descendientes del cruce eran capaces de producir grandes cantidades de algunos terpenos, incluso superiores que la cepa parental (hasta 6 ppm). Sin embargo, la capacidad de consumir glucosa y producir etanol era menor en todos los descendientes aislados, lo que les hacía inviables para determinadas aplicaciones tecnológicas (Javelot *et al.*, 1991). Al igual que en el caso anterior, este método ha sido protegido por varias patentes (Karst *et al.*, 1989; 1992; 1994, y Watanabe *et al.*, 2002 para su utilización en Sake).

55

60

65

Más recientemente, Carrau *et al.* (2005) han descrito que algunas cepas vínicas diferentes a L116 eran capaces de producir monoterpenos en mosto sintético; en concreto la cepa KU1 (Uruguay) producía $\sim 5 \mu\text{g/L}$ de linalol (cantidad que roza el umbral de detección, que es 4-10 ppb) y cantidades no detectables de otros monoterpenos como, por ejemplo geraniol. Sin embargo, en el mismo estudio, en otras cepas vínicas utilizadas industrialmente, Montrachet 522 (Universidad de California, Davis), CIVC8130 (Francia) y dos cepas uruguayas, el linalol producido estaba por debajo del umbral de detección.

Por otro lado, en las plantas los monoterpenos están presentes en los aceites esenciales de flores y frutas y son producidos, de manera específica, por las monoterpeno sintasas, que utilizan como sustrato geranil difosfato (GPP) (Bohlmann *et al.*, 1998). Este sustrato es un metabolito común en microorganismos y en organismos superiores, lo que abre la posibilidad de aplicar técnicas de ingeniería metabólica para proporcionar a un determinado microorganismo nuevos pasos en la ruta de isoprenoides, que incluyan los genes que le faltan para la fabricación de un determinado monoterpeno (Carter *et al.*, 2003 y Reiling *et al.*, 2004 en *Escherichia coli*; Oswald *et al.*, 2006 en cepas de laboratorio de *S. cerevisiae*). En los últimos diez años, distintos laboratorios han empezado a caracterizar los genes y enzimas responsables de la producción de los componentes específicos del aroma y del sabor de flores, frutas y verduras. Así, entre los genes cuyos productos determinan el olor de las flores de la especie *Clarkia breweri*, se ha caracterizado el gen *Lis* (Dudareva *et al.*, 1996; patentado por Pichersky, 1997) que codifica la enzima S-linalol sintasa (LIS) y que cataliza la producción del monoterpeno S-linalol, uno de los componentes importantes del aroma de los vinos, en una única reacción desde el GPP. Puesto que en levaduras el GPP es un intermediario de la síntesis de ergosterol, en la presente invención se ha dotado a la cepa vínica *S. cerevisiae* T₇₃ (CECT 1894; Querol *et al.*, 1992) con el gen *Lis* de *C. breweri* y se ha estudiado tanto su capacidad para producir linalol a lo largo de la vinificación como sus características fermentativas.

Recientemente, nuevos genes que codifican otras monoterpeno sintasas están siendo caracterizados. Estos genes y otros que se vayan descubriendo podrán también ser expresados en cepas adecuadas de levaduras vínicas, de manera similar al ejemplo que aquí se recoge. El gen *GES*, que en albahaca codifica la enzima geraniol sintasa (Iijima *et al.*, 2004), el gen que en uva codifica α -terpineol sintasa (Martin y Bohlmann, 2004) y el gen *QHI* que en Artemisa codifica una 3R-linalol sintasa (Jia *et al.*, 1999) son algunos ejemplos.

Probablemente *S. cerevisiae* es uno de los organismos vivos de los que se posee mayor conocimiento molecular. Desde hace casi treinta años es posible transformar genéticamente cepas de laboratorio de esta especie (Beggs 1978). A todo ello hay que sumar la disponibilidad de la secuencia nucleotídica completa del genoma de este organismo (Goffeau *et al.*, 1997) y una plétora de técnicas moleculares que han permitido y permiten avanzar en su manipulación. En la actualidad se dispone de levaduras vínicas transgénicas (YMGs) que sirven para mejorar el propio proceso de vinificación (por ejemplo facilitando la filtrabilidad) y de YMGs que sirven para mejorar las características organolépticas y/o funcionales de los vinos (revisado por: Manzanera y Orejas, 2005; Ramón *et al.*, 2005; Schuller y Casal., 2005; Verstrepen *et al.*, 2006). Recientemente en Japón se ha aprobado la utilización de una levadura recombinante, que allí no necesita ser calificada como YMG, para la elaboración de Sake (Akada, 2002).

La invención que se propone consiste en la mejora del proceso de fermentación de bebidas alcohólicas, preferentemente vinos, por el uso de un microorganismo que, habiendo sido modificado para producir monoterpeno sintasas heterólogas, conduce a una mejora del contenido aromático de la bebida.

Descripción de la invención

Descripción breve

El objeto de la presente invención lo constituye el uso de un microorganismo útil para la producción de bebidas alcohólicas elaboradas a partir de mostos o zumos de frutas, preferentemente vinos, extractos de cereales u otros productos alimenticios de origen vegetal, manipulado genéticamente, en adelante uso de la presente invención, que comprende secuencias de DNA que codifican enzimas con actividad monoterpeno sintasa que permiten la producción de monoterpenos durante la fermentación.

Un objeto particular de la presente invención es el uso de la invención donde la bebida alcohólica pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: vinos, (incluidos no espumosos, así como cava, champagne y otros espumosos), cerveza, sidra, sake, etc.

Una realización particular de la presente invención es el uso de la invención donde la bebida alcohólica es vino, preferentemente, vinos blancos, tintos o rosados a partir de mostos de uva de cualquier variedad.

Otro objeto de la presente invención es el uso de la invención donde las secuencias de DNA que codifican enzimas con actividad monoterpeno sintasa incluyen cualquier gen que codifique enzimas que catalicen la formación de monoterpenos: linalol sintasa, geraniol sintasa, α -terpineol sintasa, etc; así como cualquier secuencia de nucleótidos análoga a éstas que cifre enzimas con dicha actividad, de forma aislada o en sus posibles combinaciones.

Otra realización particular de la presente invención es el uso de la invención donde una secuencia de DNA que codifica una enzima con actividad monoterpeno sintasa incluye la secuencia del gen *Lis* de *C. breweri* (SEQ ID NO1), que codifica una linalol sintasa. O, conforme anteriormente se ha explicado, la proteína que codifica, la enzima con

actividad S-linalol sintasa (SEQ ID NO2), así como cualquier secuencia de nucleótidos o de aminoácidos (aas) análoga a éstas.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de la invención en el cual el microorganismo es de interés en enología: levaduras o bacterias.

Una realización particular de la presente invención lo constituye el uso de la invención donde el microorganismo es una levadura vínica de la especie *S. cerevisiae*, preferentemente la cepa *S. cerevisiae* YR64 (pG1-Lis-URA) (CECT 12032), que comprende la secuencia de DNA del gen que en *C. breweri* codifica S-linalol sintasa (SEQ ID NO1).

Una última realización particular de la presente invención es el uso de la presente invención en la elaboración de bebidas alcohólicas conjuntamente con otros microorganismos, recombinantes o no, para producir distintas combinaciones de monoterpenos aromáticos durante la fermentación.

15 Descripción detallada de la invención

En la presente invención se describe un método totalmente diferente a los antes citados (ver estado de la técnica) para mantener, aumentar y/o modificar el contenido terpénico de una bebida alcohólica y conseguir así que ésta tenga un aroma más favorable y/o diferente. El método de mejora propuesto, se centra en la fermentación de mostos, preferentemente de uva, para la producción de vinos; siendo un método extensible a la producción de otras bebidas alcohólicas obtenidas por fermentación a partir de distintas materias primas vegetales, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, por ejemplo: zumos de frutas, extractos de cereales, etc.

Dicho método se basa en la manipulación genética de levaduras vínicas para que sean capaces de producir monoterpeno sintasas heterólogas y como consecuencia produzcan y excreten de *novi* monoterpenos durante la fermentación alcohólica. La presente invención se basa en la observación de que la expresión de un gen, que en plantas codifica una S-linalol sintasa, en una levadura vínica (derivada de la cepa industrial *S. cerevisiae* T₇₃, Lallemand), que de manera natural aparentemente no produce linalol (ver figuras 2 y 5), induce la concomitante presencia de este monoterpeno aromático en los vinos producidos con dicha levadura recombinante. Más concretamente, se parte de la secuencia del cDNA del gen *Lis* de *C. breweri*, que codifica una S-linalol sintasa. Este gen se clona entre el promotor del gen *TDH3* y el terminador del gen *PGK1* de *S. cerevisiae*, en un vector de expresión de levaduras. La transformación de dicha cepa vínica con el vector anterior rinde la correspondiente levadura vínica de características mejoradas.

La mejora del proceso de vinificación que aquí se propone ha sido realizada en un mutante generado a partir de la levadura vínica *S. cerevisiae* T₇₃ (el mutante T₇₃-4, auxótrofo de uracilo; Puig *et al.*, 1998) y el gen *Lis*, que en *C. breweri* codifica la enzima S-linalol sintasa (Ejemplo 1). Se ha comprobado que la cepa vínica transformada es capaz, sin más manipulaciones de la ruta y sin el aporte de precursores, de producir y excretar linalol libre a lo largo de la vinificación. Mientras que los vinos resultantes de la fermentación de mostos Parellada con las cepas T₇₃ y T₇₃-4 transformada con un plásmido control que no lleva el cassette de expresión del gen *Lis* - el llamado pG1-URA - no tienen cantidades detectables de linalol, aquellos fermentados con las levaduras que llevan el plásmido pG1-Lis-URA presentan cantidades de linalol relevantes desde el punto de vista sensorial, ya que sobrepasan el umbral de detección del mismo (Burdock, 2002) (Ejemplo 2). Por lo tanto, en la presente invención se ha demostrado que, a diferencia de lo que ocurre con otras estrategias ya descritas (ver estado de la técnica), (i) la expresión de cDNAs que codifican monoterpeno sintasas en levaduras vínicas es suficiente para la producción de *novi* de monoterpenos, independientemente de la materia prima; (ii) que es posible cambiar rutas metabólicas en cepas vínicas de *Saccharomyces*, en concreto la ruta de isoprenoides, para la producción de linalol y eventualmente otros monoterpenos; y (iii) que es posible conseguir una producción continuada de linalol en levaduras sin que esa concentración sea tóxica.

Además, se ha constatado que tanto la producción de alcohol como la tasa fermentativa de estas levaduras recombinantes son comparables a las de una levadura comercial, resultado de suma importancia de cara a su aplicabilidad, indicando que la expresión del gen *Lis* en la levadura vínica modificada no cambia sus características fermentativas (Ejemplo 3).

Hay que destacar que con las mencionadas levaduras modificadas genéticamente tampoco se tienen los problemas técnicos, antes mencionados, que surgen cuando se vinifica con levaduras portadoras de mutaciones en los genes *ERG*. En cuanto a su comparación con las levaduras que de forma natural producen monoterpenos, no todas las levaduras vínicas son capaces de producirlos en cantidades detectables, y además con esta invención se consiguen mejores rendimientos y se abre las puertas a la modificación dirigida de la composición de volátiles.

Por lo tanto, el objeto de la presente invención lo constituye el uso de un microorganismo útil para la producción de bebidas alcohólicas elaboradas a partir de mostos o zumos de frutas, preferentemente vinos, extractos de cereales u otros productos alimenticios de origen vegetal, manipulado genéticamente, en adelante uso de la presente invención, que comprende secuencias de DNA que codifican enzimas con actividad monoterpeno sintasa que permiten la producción de monoterpenos durante la fermentación.

Un objeto particular de la presente invención es el uso de la invención donde la bebida alcohólica pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: vinos, (incluidos no espumosos, así como cava, champagne y otros espumosos), cerveza, sidra, sake, etc.

ES 2 324 508 B1

Una realización particular de la presente invención es el uso de la invención donde la bebida alcohólica es vino, preferentemente, vinos blancos, tintos o rosados a partir de mostos de uva de cualquier variedad.

Otro objeto de la presente invención es el uso de la invención donde las secuencias de DNA que codifican enzimas con actividad monoterpene sintasa incluyen cualquier gen que codifique enzimas que catalicen la formación de monoterpeneos: linalol sintasa, geraniol sintasa, α -terpineol sintasa, etc; así como cualquier secuencia de nucleótidos análoga a éstas que cifre enzimas con dicha actividad, de forma aislada o en sus posibles combinaciones.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “monoterpene sintasa” se refiere tanto a la secuencia de nucleótidos del gen en cuestión, como a la proteína que codifica, una enzima con actividad monoterpene sintasa, así como a cualquier secuencia de nucleótidos o de aminoácidos (aas) análoga a éstas de otras especies. En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir también cualquier secuencia de nucleótidos o aminoácidos que pueda ser aislada o construida en base a las secuencias de nucleótidos o aas contempladas en la presente memoria, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos o aas, conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos o aas, la adición de uno o más nucleótidos o aas en cualquier parte de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos o aas en cualquier extremo o en el interior de la secuencia, y que constituya una secuencia codificante o péptido con actividad similar a la secuencia de la invención, es decir, sea capaz de sintetizar monoterpeneos.

En general, una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos comentada anteriormente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos o aas. en cuestión tienen un grado de identidad de, al menos, un 40%, preferentemente de, al menos, un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

Secuencias de nucleótidos codificantes de enzimas con actividad monoterpene sintasa se conocen hoy en día con tal detalle, que pueden obtenerse por un experto mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica (Sambrook y Russel, 2001). Dichas secuencias de nucleótidos pueden estar en un fragmento lineal de DNA integradas en el genoma, o bien integradas en un vector que permita la expresión de las mismas, en condiciones adecuadas, en distintos microorganismos de tal forma que a la vez que realizan la fermentación alcohólica y otras fermentaciones relacionadas puedan producir linalol u otros monoterpeneos a partir de cualquier mosto, zumo, o vino, de partida.

Otra realización particular de la presente invención es el uso de la invención donde una secuencia de DNA que codifica una enzima con actividad monoterpene sintasa incluye la secuencia del gen *Lis* de *C. breweri* (SEQ ID NO1), que codifica una linalol sintasa. O, conforme anteriormente se ha explicado, la proteína que codifica, la enzima con actividad S-linalol sintasa (SEQ ID NO2), así como cualquier secuencia de nucleótidos o de aminoácidos (aas) análoga a éstas.

Asimismo, al hablar de “secuencias de DNA que codifican enzimas con actividad monoterpene sintasa” se incluyen también las secuencias ya conocidas, y al alcance de un experto medio en la materia, de los genes que codifican geraniol sintasa, α -terpineol sintasa, 3R-linalol sintasa (Iijima *et al.*, 2004; Martin y Bohlmann, 2004; Jia *et al.*, 1999), etc.; así como otras secuencias de monoterpene sintasas que puedan llegar a aislarse, caracterizarse, darse a conocer y ser utilizadas con el mismo objetivo que la presente invención. O, conforme anteriormente se ha explicado, las proteínas que codifican, así como cualquier secuencia de nucleótidos o de aminoácidos (aas) análogas a éstas de otras especies. Éstas y otras secuencias pueden conseguirse en bases de datos de dominio público y pueden obtenerse por un experto mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica.

Puesto que cada monoterpene tiene un aroma peculiar y diferente umbral sensorial, estas realizaciones también podrían tener un gran impacto en las propiedades sensoriales de los vinos, lo que rendiría “starters” con distintas habilidades en cuanto a la composición de terpenos. En este sentido, como alternativa a las fermentaciones con uno o distintos microorganismos, también cabe la posibilidad de co-transformar el microorganismo para el uso de la presente invención con varios de los genes anteriores.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de la invención en el cual el microorganismo es de interés en enología: levaduras o bacterias.

En esta definición de microorganismo se incluyen también otros microorganismos, distintos a *S. cerevisiae*, que si bien no son responsables del propio proceso de vinificación, intervienen en determinadas circunstancias en dicho proceso (p.e. otras especies levaduriformes y también bacterias).

Tal como se utiliza en la presente invención el término levaduras se refiere a levaduras pertenecientes, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, al siguiente grupo: *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces*, etc.

Una realización particular de la presente invención lo constituye el uso de la invención donde el microorganismo es una levadura vínica de la especie *S. cerevisiae*, preferentemente a cepa *S. cerevisiae* YR64 (pG1-Lis-URA) (CECT 12032), que comprende la secuencia de DNA del gen que en *C. breweri* codifica S-linalol sintasa (SEQ ID NO1).

Tal como se utiliza en la presente invención el término bacterias se refiere, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, a bacterias pertenecientes al siguiente grupo: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, etc.

5 Por otro lado, el microorganismo uso de la presente invención puede ser utilizado en la elaboración de bebidas alcohólicas conjuntamente con otros microorganismos, recombinantes o no, para producir distintas combinaciones de monoterpenos aromáticos durante la fermentación alcohólica.

Descripción del contenido de las figuras

10 Figura 1. Diagrama del plásmido desarrollado en esta invención (Se indican las enzimas utilizadas para su construcción así como otras de corte único): pG1-Lis-URA (Figura 1A) y su control pG1-URA (Figura 1B).

15 Figura 2. Evolución del crecimiento de los transformantes YR63 (pG1-Lis-URA), YR64 (pG1-Lis-URA; CECT 12032), e YR65 (pG1-URA) en medio YPD (Figura 2A) y su cinética de producción de linalol (Figura 2B).

20 Figura 3. Perfiles cromatográficos de los medios de cultivo de las cepas YR63 (pG1-Lis-URA) (3A), YR64 (pG1-Lis-URA; CECT 12032) (3B) e YR65 (pG1-URA) (3C), tras una incubación de 24 horas en medio YPD. La flecha indica el tiempo de elución del linalol establecido por comparación con un patrón comercial.

Figura 4. Comparación de los perfiles iónicos del monoterpeno producido por la cepa YR64 (pG1-Lis-URA) y del linalol obtenidos por GC-MS.

25 Figura 5. Microvinificaciones. Evolución del crecimiento (5A), consumo de azúcares (5B), producción de etanol (5C) y cinética de acumulación de linalol (5D) de las cepas YR64 (pG1-Lis-URA; CECT 12032) y los controles T₇₃ e YR65 (pG1-URA). Los resultados son la media de tres experimentos independientes.

Ejemplos de realización

30 Ejemplo 1

Construcción de una cepa de levadura vínica que sintetiza de novo linalol

35 1.1.- Clonación del gen *Lis* de *Clarkia breweri* en un vector de expresión de levaduras

La región codificante del gen *Lis* de *C. breweri* (Dudareva *et al.*, 1996) (SEQ ID NO1) se clonó en el vector pG-1 (Schena *et al.*, 1991) entre el promotor del gen *TDH3* de *S. cerevisiae* (codifica gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, antes llamado *GPD_p*) y el terminador del gen *PGK1* de *S. cerevisiae* (codifica 3-fosfoglicerato kinasa) a partir de dos fragmentos, uno de 650 pb y otro de 2080 pb. El primero de ellos se obtuvo en una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos LisBgl2 (SEQ ID NO3) y LisXba1 (SEQ ID NO4) y el plásmido pR65 (plásmido pBlueScript II SK+ que contiene el cDNA del gen *Lis*) como DNA molde. Para la reacción de PCR se usó la enzima Expand High Fidelity (Roche). La amplificación consistió en 10 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 52.5°C y 45 segundos a 72°C y a continuación de otros 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 52.5°C y 45 segundos a 72°C, con incrementos de 5 segundos en el tiempo de extensión por cada ciclo.

45 El producto de PCR, tras ser purificado, se clonó en el vector pGEM-T[®] Easy (plásmido para la clonación de productos de PCR, Promega) para rendir el plásmido pGEM-Lis. La secuenciación del producto de PCR reveló la ausencia de errores de polimerización ocurridos durante la amplificación del mismo; si bien se identificaron dos cambios en dos aminoácidos, no ocurridos durante la reacción de polimerización, que difieren de la secuencia de la base de datos (NCBI AAC49395). Se trató este plásmido con las enzimas *Bgl*III y *Xba*I y se aisló el fragmento de 650 pb. El segundo fragmento (2080 pb), necesario para completar la ORF del gen *Lis*, se obtuvo por restricción del plásmido pR65 con las enzimas *Xba*I y *Sall*. Ambos fragmentos fueron ligados en el vector pG-1, previamente digerido con las enzimas *Bam*HI y *Sall*, para construir el plásmido pG1-Lis, que lleva el cassette de expresión *TDH3_p::Lis::PGK_i* y el marcador de selección *TRP1*.

55 Para la construcción del plásmido pG1-Lis-URA (Figura 1A), que lleva además el marcador de selección *URA3*, en el sitio *Sma*I del plásmido pG1-Lis se subclonó un fragmento de aproximadamente 1500 pb que contiene el gen *URA3* de *S. cerevisiae* generado por PCR usando como molde DNA genómico de la cepa T₇₃ y los oligonucleótidos *URA1* (SEQ ID NO5) y *URA4* (SEQ ID NO6). Las condiciones de PCR sólo difirieron de las anteriores en la temperatura de anillamiento, que fue de 55°C. El fragmento anterior fue digerido con la enzima *Hind*III y los extremos protuberantes se rellenaron con la enzima Klenow; el fragmento resultante se clonó en el sitio *Sma*I del plásmido pG1-Lis-URA.

De manera similar, a partir del plásmido PG-1 se construyó el vector control pG1-URA (Figura 1B).

65 1.2.- Construcción de una cepa de levadura vínica que sintetiza de novo linalol

A continuación, se transformó la cepa vínica *S. cerevisiae* T₇₃-4 (ura3::470/ura3::470) (Puig *et al.*, 1998), derivada de la cepa industrial T₇₃, por el método del acetato de litio (Gietz *et al.*, 1995) mejorado, (Puig *et al.*, 1998) con el

ES 2 324 508 B1

plásmido pG1-Lis-URA y los transformantes se seleccionaron en medio sin uracilo. Se analizaron varios transformantes distintos y todos se comportaron de manera similar en cuanto a la producción de linalol; los transformantes YR63 (pG1-Lis-URA) e YR64 (pG1-Lis-URA; CECT 12032) fueron aislados para posteriores estudios. Se transformó además la cepa T₇₃-4 con el plásmido pG1-URA para obtener una cepa control de las levaduras recombinantes generadas, denominándola YR65.

La expresión del gen *Lis* se comprobó, indirectamente, por la detección de linalol mediante cromatografía de gases (GC) en los medios de cultivo (YPD: 2% glucosa; 2% peptona; 1% extracto de levadura) donde se crecieron los transformantes YR63, YR64 e YR65. Ver a continuación.

Ejemplo 2

Fisiología de las levaduras recombinantes. Análisis de metabolitos en las S. cerevisiae que expresan Lis

Se llevó a cabo la detección del linalol producido por las cepas YR63 (pG1-Lis-URA), YR64 (pG1-Lis-URA; CECT 12032) e YR65 (pG1-URA) mediante la técnica de microextracción en fase sólida, en espacio de cabeza, acoplada a cromatografía de gases (HS-SPME-GC). La microextracción en fase sólida se realizó con fibras de polidimetilsiloxano (PDMS). Se tomaron alícuotas de 3 mL que se introdujeron en viales de 9 mL que contenían una barra magnética de 8x3 mm y 0.6 gr de NaCl (para intensificar la respuesta en la extracción del analito) (Arthur *et al.*, 1992). Asimismo, para su cuantificación posterior, a las muestras se les añadió una cantidad fija del patrón interno 2-octanol (15 μ L de una solución al 0.005% p/v en etanol). Los viales se cerraron herméticamente y se dejaron 2 horas, con agitación, a temperatura ambiente, para conseguir el equilibrio de fases (líquido-vapor). La fibra de PDMS se introdujo a través del septum de teflón de los tapones en el espacio de cabeza del tubo. Tras un período de adsorción de 30 minutos, la fibra se inyectó en el cromatógrafo de gases (HP 5890 series II), en el que se liberaron los analitos durante cuatro minutos.

Para la cromatografía se utilizó una columna capilar HP innowax (Hewlett-Packard) de 15 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 micras de espesor de fase. La temperatura del inyector fue de 220°C y la del detector de 280°C. La temperatura del horno fue inicialmente de 60°C durante 5 minutos y después se incrementó a razón de 5°C/min hasta 190°C, y a razón de 20°C/min hasta 250°C, temperatura a la que se mantuvo durante 2 minutos. La identificación de linalol y otros componentes volátiles se llevó a cabo mediante comparación de sus tiempos de retención con el del patrón comercial. Para obtener su concentración inicialmente se construyó una curva de calibración con distintas concentraciones de linalol (Fluka) y posteriormente se relacionó el área de los cromatogramas con aquella.

Las cepas YR63 (pG1-Lis-URA), YR64 (pG1-Lis-URA) e YR65 fueron crecidas durante 18 horas en medio SD selectivo (2% glucosa, 0.5% sulfato amónico, 0.143% YNB) y entonces en medio YPD (10⁶ células/mL en matraces de 0.5 L con 100 mL de medio) y a distintos tiempos, durante 97 horas a 30°C con una agitación de 100 rpm, se tomaron muestras para hacer recuentos (Figura 2). No se observaron diferencias significativas en las cinéticas de crecimiento de las dos cepas que producen linalol, YR63 (pG1-Lis-URA) e YR64 (pG1-Lis-URA), y la levadura control, YR65 (Figura 2A). Tanto en la cepa T₇₃-4 sin transformar (datos no mostrados) como en los transformantes de ésta con el plásmido pG1-URA (YR65) no se detectó linalol; tan sólo las levaduras transformadas con pG1-Lis-URA, YR63 e YR64 produjeron linalol (Figura 2B). La producción máxima de linalol (80 μ g/L) se alcanza hacia la mitad de la fase exponencial de crecimiento.

No se observan diferencias, salvo el pico del linalol, entre los cromatogramas de las cepas YR63 (pG1-Lis-URA) (Figura 3A) e YR64 (pG1-Lis-URA) (Figura 3B) y la cepa control YR65 (Figura 3C), lo que sugiere la ausencia de bioconversiones a partir del linalol producido en las condiciones experimentales del estudio.

Además, se confirmó mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) que el volátil que se había identificado por el tiempo de retención en CG es linalol. Para ello las cepas YR63 e YR64 (pG1-Lis-URA) fueron crecidas en medio YPD y se recogieron muestras a las 20 horas (máximo de producción de linalol). Las muestras se analizaron mediante la técnica de microextracción en fase sólida, en espacio de cabeza, acoplada a cromatografía de gases con detector de masas. La GC-MS fue llevada a cabo en un cromatógrafo Agilent 6890 acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5973N (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). El espectro de iones del compuesto que eluye en el tiempo esperado al linalol fue el mismo que el espectro del linalol (Figura 4). De este modo se comprobó inequívocamente que el volátil que producían las cepas recombinantes YR63 e YR64, (pG1-Lis-URA) era linalol.

Ejemplo 3

Ensayos de microvinificación con la cepa vínica recombinante YR64 (CECT 12032)

Para averiguar si las levaduras recombinantes antes construidas eran capaces de llevar a cabo la vinificación hasta el final, si los parámetros físico-químicos del vino son similares a los del vino realizado con una levadura de uso industrial y si las manipulaciones genéticas antes realizadas llevan consigo cambios en el perfil de volátiles que se pudieran detectar en catas, se llevaron a cabo microvinificaciones con la cepa YR64 (pG1-Lis-URA; CECT 12032) y los controles T₇₃ e YR65 (pG1-URA). Se utilizó mosto Parellada de la cosecha del 2003 procedente de Villafranca del Penedés. El mosto se filtró a través de cartuchos Sartopure PP2 de 1.2 μ m de poro (Sartorius) y posteriormente se esterilizó añadiendo Velcorin (dimetil dicarbonato) al 0,2% v/v, y se incubó a temperatura ambiente toda la noche.

ES 2 324 508 B1

Finalmente, fue suplementado con 0,3 g/L de activador de la fermentación (LALVIN NUTRIENT VIT, Lallemand). Las microvinificaciones se llevaron a cabo por triplicado, a 18°C y en condiciones estándar (Querol *et al.*, 1992).

Las tres cepas anteriores se crecieron durante 18 horas en medio selectivo SD (2% glucosa, 0,5% sulfato amónico, 0,143% YNB). Tras este crecimiento las células se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en mosto y se inocularon 10⁶ células/mL en botellas de 250 mL con 225 mL de mosto estéril cerradas con tapón de rosca. A lo largo del experimento se tomaron muestras a distintos tiempos y en cada una de ellas se determinó el número de células, el consumo de azúcares, y la producción de etanol y linalol. El seguimiento de la evolución de la fermentación se realizó midiendo la D.O. a 600 nm en un espectrofotómetro Ultrospecc 2000 (Pharmacia, Biotech, England). El consumo de azúcares se siguió midiendo los grados BRIX con un refractómetro (Carl Zeiss, Germany). En los últimos días de la vinificación se empleó el multianalizador automático ECHO/ENOSYS (Tecnova S.A.) con el fin de determinar el final de la fermentación, esto es, cuando el contenido de azúcares fue menor de 2 g/L. El etanol se midió empleando un espectrofotómetro de infrarrojo (Enfrascan, Alliance Instruments, France). En los vinos finales se llevó a cabo el estudio de volátiles utilizando la técnica antes descrita (ejemplo 2).

Como se observa en la Figura 5A, la evolución del crecimiento de las tres cepas fue similar, aunque la portadora del plásmido pG1-Lis-URA, YR64 (CECT 12032), tiene una cinética de crecimiento ligeramente desplazada con respecto a la cepa comercial. El consumo de azúcares (Figura 5B) fue también similar en todas las cepas, llegando en todos los casos a un nivel inferior a los 2 g/L tras 6 días de fermentación. Del mismo modo, la cinética de producción de etanol (Figura 5C) fue similar en las tres vinificaciones alcanzando en todas ellas un grado alcohólico próximo al 8%. Este valor es ligeramente inferior al de los vinos comerciales a causa de la baja concentración de azúcares de partida del mosto, que no superaba los 130 g/L. Estos resultados indicaron que la expresión del gen *Lis* en la levadura vínica modificada aparentemente no modificaba sus características fermentativas.

En cuanto a la cinética de acumulación de linalol (Figura 5D), se observó que la cepa YR64 (CECT 12032), portadora del plásmido PG1-Lis-URA, era capaz de producir este monoterpeno durante la vinificación. Las otras dos cepas control no acumularon linalol durante el ensayo. La máxima concentración de linalol se alcanzó en el segundo día de fermentación (26,01 µg/L), punto a partir del cual fue bajando paulatinamente (hasta 18,60 µg/L en el vino acabado). Puesto que el umbral de detección olfativa de este compuesto se ha fijado en 4-10 µg/L, estos resultados validan la invención propuesta.

Referencias

- Akada R. (2002). Genetically modified industrial yeast ready for application. *J. Biosci. Bioeng.* 94: 536-544.
- Arthur C.L., Killan L.M., Buchhold K.D. y Pawliszyn J. (1992). Automation and optimization of solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* 64: 1960-1966.
- Beggs J.D. (1978). Transformation of yeasts by replicating hybrid plasmid. *Nature* 275: 184-189.
- Bohlmann J., Meyer-Gauen G. y Croteau R. (1998). Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4126-4133.
- Burdock G.A. (2002). Fenaroli's handbook of flavor ingredients. 4a edición. (Ed.: Burdock G.A.). CRC Press, pp 972-973.
- Carrau F.M., Medina K., Boido E., Farina L., Gagero C., Dellacassa E., Versini G. y Henschke P.A. (2005). De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters* 243: 107-115.
- Carter O.A., Peters R.J., y Croteau R. (2003). Monoterpene biosynthesis pathway construction in *Escherichia coli*. *Phytochemistry* 64: 425-433.
- Chambon C., Ladeveze V., Oulmouden A., Servouse M. y Karst F. (1990a). Isolation and properties of yeast mutants affected in farnesyl diphosphate synthetase. *Current Genetics* 18: 41-46.
- Chambon C., Ladeveze V., Servouse M., Blanchard L., Javelot C., Bladescu B. y Karst F. (1990b). Sterol pathway in yeast. Identification and properties of mutant strains defective in mevalonate diphosphate decarboxylase and farnesyl diphosphate synthetase. *Lipids* 26: 633-636.
- Croteau R.B., Kutchan T.M. y Lewis N.G. (2000). Natural products (secondary metabolites). En: Biochemistry and molecular biology of plants. (Ed.: Buchanan B.B. *et al.*). American society of plant physiologists, Rockville MD, pp 1250-1318.
- Crowell P. (1999). Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *J. Nutr.* 129: 775S-778S.
- Dudareva N., Cseke L., Blanc V.M. y Pichersky E. (1996). Evolution of floral scent in *Clarkia*: Novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. *The Plant Cell* 8: 1137-1148.

- Estévez P., Gil M.L. y Falqué E. (2004).** Effects of seven yeast strains on the volatile composition of Palomino wines. *Int. J. Food Sci. Technol.* **39**: 61-69.
- Gietz R.D., Schiestl R.H., Willems A.R., Woods R.A. (1995).** Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**:355-60
- Gil J.V. and Vallés S. (2001).** Effect of macerating enzymes on red wine aroma at laboratory scale: exogenous addition or expression by transgenic wine yeast. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 5515-5523.
- Gil J.V., Manzanares P., Genovés S., Vallés S. y González-Candelas L. (2005).** Over-production of the major exoglucanase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to an increase in the aroma of wine. *Int. J. Food Microbiol.* **15**: 57-68.
- Goffeau A. et al. (1997).** The yeast genome directory. *Nature* **387**: 1-105.
- Günata Y.Z., Bayanove C.L., Baumes R.L. y Codonnier R.E. (1985a).** Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J. Chrom.* **331**: 83-90.
- Günata Y.Z., Bayanove C.L., Baumes R.L. y Cordonnier R. (1985b).** The aroma of grapes. Localisation and evolution of free and bound fractions of some grape aroma components c.v. Muscat during first development and maturation. *J. Sci. Food. Agric.* **36**: 857-862.
- Günata Y.Z., Bitteur J.M., Brillouet J.M., Bayanove C.L. y Cordonnier R. (1988).** Sequential enzymatic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydr. Res.* **184**: 139-149.
- Günata Y.Z., Bayanove C.L., Tapiero C. y Cordonier R. (1990).** Hydrolysis of grape monoterpenyl beta-D-glucosides by various beta glucosidases. *J. Agric. Food. Chem* **38**: 1232-1236.
- Günata Z. (2003).** Flavor enhancement in fruit juices and derived beverages by exogenous glycosidases and consequences of the use of enzyme preparations. Handbook of food enzymology. (Eds.: Whitaker J.R., Voragen A.G.J. y Wong D.W.S.). *Marcel Dekker, Inc.* NY. Basel. pp 303-329.
- Iijima Y., Gang D.R., Fridman E., Lewinsohn E. y Pichersky E. (2004).** Characterization of geraniol synthase from the peltate gland of sweet basil. *Plant Physiol.* **134**: 370-379.
- Javelot C., Girard P., Colonna-Ceccaldi B. y Vladescu B. (1991).** Introduction a terpene-producing ability in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnol.* **21**: 239-252.
- Jia J.W., Crock J., Lu S., Croteau R. y Chen X.Y. (1999).** (3R)-Linalool synthase from *Artemisa annua* L.: cDNA isolation, characterization, and wound induction. *Arch. Biochem. Biophys.* **372**: 143-149.
- King A.J. y Dickinson J.R. (2000).** Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **16**: 499-506.
- López Tamames E., Carro-Mariño N., Günata Y.Z., Sapis C., Baumes R. y Bayanove C. (1997).** Potencial aroma in several varieties of Spanish grapes. *J. Agric. Food. Chem.* **45**: 1729-1735.
- Manzanares P. y Orejas M. (2005).** La nueva biotecnología apuesta por la vinificación. CTC Alimentación. **26**: 49-54.
- Marais J. (1983).** Terpenes in the aroma of grapes and wines: A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **4**: 49-60.
- Martin D.M. y Bohlmann J. (2004).** Identification of *Vitis vinifera* (a)-terpineol synthase by in silico screening of full-length cDNA ESTs and functional characterization of recombinant terpene synthase. *Phytochemistry* **65**: 1223-1229.
- Oswald M., Fischer M., Dirninger N. y Karst F. (2006).** Monoterpenoid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* (en prensa).
- Park S.K., Morrison J.C., Adams D.O. y Noble A.C. (1991).** Distribution of free and glycosidically bound monoterpenes in the skin and mesocarp of Muscat of Alexandria during development. *J. Agric. Food. Chem.* **39**: 514-518.
- Puig S., Ramón D. y Pérez-Ortín J.E. (1998).** Optimized method to obtain stable food-safe recombinant wine yeast strains. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 1689-1693.
- Querol A., Huerta T., Barrio E. y Ramón D. (1992).** Dry yeast strain for the use in fermentation of Alicante wines: selection and DNA patterns. *J. Food Sci.* **57**: 183-185.

- Ramón D., Genovés S. Gil J.V., Herrero O., MacCabe A.P.M., Manzanares P., Matallana E., Orejas M., Ober G. y Vallés S. (2005).** Milestones in wine biotechnology. *Minerva Biotec.* 17: 33-45.
- Reiling K.K., Yoshikuni Y., Martin V.J.J., Newman J., Bohlmann J. Y Keasling J.D. (2004).** Mono and diterpene production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 87: 200-212.
- Ribéreau-Gayon P., Boidron J.N. y Terrier A. (1975).** Aroma in muscat grape varieties. *J. Agric. Food Chem.* 23: 1042-1047.
- Sambrook y Russel,** "Molecular cloning, a Laboratory Manual" 3rd ed., *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, N.Y., 2001 vol 1-3.
- Schena M., Picard D. y Yamamoto K.R. (1991).** Vectors for constitutive and inducible gene expression in yeast. En: Guide to yeast genetics and Molecular Biology. Methods in enzymology vol 194. (Eds: Gutrie C. y Fink G.R.). *Academic Press*, INC. pp 389-398.
- Schuller D. y Casal M. (2005).** The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 292-304.
- Verstrepen K.J., Chambers P.J. y Pretorius I.S. (2006).** The development of superior yeast strains for the food and beverage industries: challenges, opportunities and potential benefits. En: The Yeast Handbook vol. 2. Yeast in food and beverages (Eds: Querol A. y Fleet G.H.). *Springer-Verlag*, pp 399-444.
- Williams P.J., Strauss C.R. y Wilson B. (1980).** New linalool derivatives in Muscat Alexandria grapes and wines. *Phytochemistry* 19: 1137-1139.
- Wise M.L. y Croteau R. (1999).** Monoterpene biosynthesis. In Comprehensive natural products chemistry: Isoprenoids including carotenoids and steroids (vol. 2). (Ed. Cane D.E.). *Elsevier Science*. pp 97-153.
- Patentes**
- Fowler T., Barnett C.C., Shoemaker S.** Method enhancing flavor and aroma in foods by overexpression of beta-glucosidase. *Genencor Int.* US Patent: US5997913. 1999-12-07.
- Günata Z., Bitteur S., Baumes R., Brillouet J.M., Tapiero C., Bayonove C., y Cordonnier R.** Process for obtaining aroma components and aromas from their precursors of a glycosidic nature, and aroma components and aromas thereby obtained. *INRA-Gist Brocades*. WO1989EP00250. 1989-09-21.
- Karst F. y Vladescu B.D.V.** Process for obtaining terpenic aromas by a microbiological process. Pernord R.. Patente Europea: EP 0313465. 1989-04-26. "La presente invención se refiere a un procedimiento para obtener aromas terpénicos, en particular para la aromatización de bebidas, por medio de un procedimiento microbiológico que emplea mutantes de *S. cerevisiae*".
- Karst F., Javelot C.J.E., Chambon C., Vladescu B.D.V.** Method of alcoholic fermentation to obtain muscat type aromas, Pernod R. y Karst F. WO9216611. 1992-10-01.
- Karst F., Javelot C.J.E., Chambon C., Vladescu B.D.V.** Alcoholic fermentation of plant-derived materials using modified industrial yeast to produce Muscat flavouring; yeast therefor. *Pernord R.* NZ241909. 1994-06-27.
- Pichersky E.** Use of linalool synthase in genetic engineering of scent production. Universidad de Michigan. WO9715584. 1997-05-01. "The present invention relates generally to the fields of the floral emission of monoterpenes and the production of monoterpenes by plants, and also the production of enhanced scent and taste in plants".
- Ramón D., González R., Pérez-González J.A. y Querol A.** 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. *CSIC*. Patente Española: ES2059280. 1994-11-01.
- Rosi I. y Paolo R.** Procedimiento di immobilizzazione di una frazione enzimatica extracellulare per it trattamento di mosti, vini, altre bevande. *Consiglio Nazionale Recherche*. ITRM950256. 1996-10-21.
- Vilanova de la Torre M., González Villa T. y Sieiro Vázquez C.** Construction of a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* oenological yeast strain that overexpress and endololylgalacturonase, which is intended for use in wine production. *Universidad de Santiago de Compostela*. WO2004005519. 2004-01-15.
- Watanabe M., Ueda M., Asai T. y Nishimura A.** Monoterpene alcohol-producing yeast and refined sake. *Hakutsuru Sake Brewing*. Número de Patente: JP2002238572. 2002-08-27.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de elaboración de bebidas alcohólicas **caracterizado** por la utilización de microorganismos modificados para que expresen genes exógenos que codifican monoterpeno sintasas, preferentemente linalol sintasa, lo que les capacita para la producción de *novo* de monoterpenos.
- 10 2. Procedimiento de elaboración de bebidas alcohólicas según la reivindicación 1 **caracterizado** por que el microorganismo es una levadura de interés en enología.
- 15 3. Procedimiento de elaboración de bebidas alcohólicas según las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** por que la levadura pertenece preferentemente al siguiente grupo: *Saccharomyces*, *Hanseniaspora (Kloeckera)*, *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces*.
- 20 4. Procedimiento de elaboración de bebidas alcohólicas según las reivindicaciones de la 1 a la 3 **caracterizado** por que la levadura es la especie *Saccharomyces cerevisiae*.
- 25 5. Procedimiento de elaboración de bebidas alcohólicas según las reivindicaciones 1 y 4 **caracterizado** por que el microorganismo es *S. cerevisiae* YR64 transformado con la secuencia SEQ ID NO1(CECT 12032).
- 30 6. Procedimiento de elaboración de bebidas alcohólicas según la reivindicación 1 **caracterizado** por que el microorganismo es una bacteria de interés en enología.
- 35 7. Procedimiento de elaboración de bebidas alcohólicas según las reivindicaciones 1 y 6 **caracterizado** por que la bacteria pertenece preferentemente al siguiente grupo: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*.
- 40 8. Procedimiento de elaboración de bebidas alcohólicas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** por que el microorganismo incluye secuencias nucleotídicas que codifican una o varias monoterpeno sintasas, preferentemente linalol sintasas, geraniol sintasas, α -terpineol sintasas.
- 45 9. Procedimiento de elaboración de bebidas alcohólicas según la reivindicación 8 **caracterizado** por que el microorganismo incluye preferentemente la secuencia del gen *Lis* de *C. breweri* (SEQ ID NO1), que codifica una linafol sintasa o cualquier secuencia de nucleótidos análoga a ésta y que se expresa de manera funcional.
- 50 10. Procedimiento de elaboración de bebidas alcohólicas según las reivindicaciones 8 y 9 **caracterizado** por que las actividades monoterpeno sintasa están codificadas en uno o varios microorganismos, utilizados conjuntamente o de manera aislada.
- 55 11. Procedimiento de elaboración de bebidas alcohólicas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** por que la bebida fermentada pertenece preferentemente al siguiente grupo: vinos (incluidos tanto no espumosos como cava, champagne y otros espumosos), cerveza, sidra, sake.
- 60 12. Procedimiento de elaboración de bebidas alcohólicas según la reivindicación 11, **caracterizado** por que la bebida fermentada es vino: vino blanco, tinto o rosado obtenido a partir de mostos de uva de cualquier variedad.
- 65

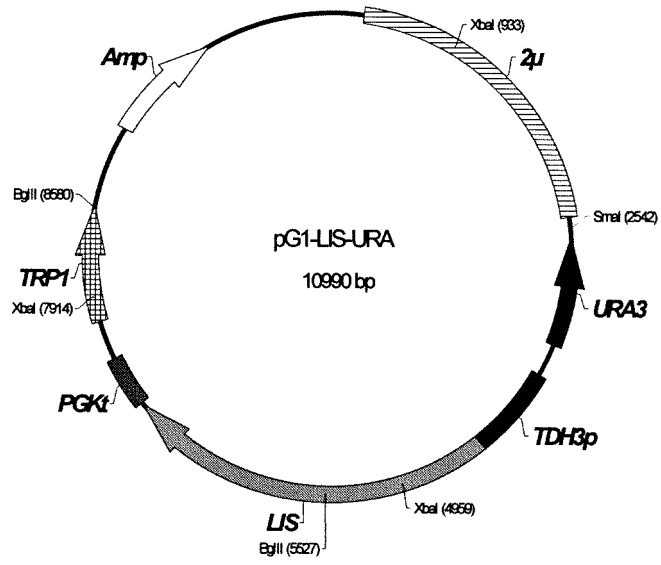


Figura 1A

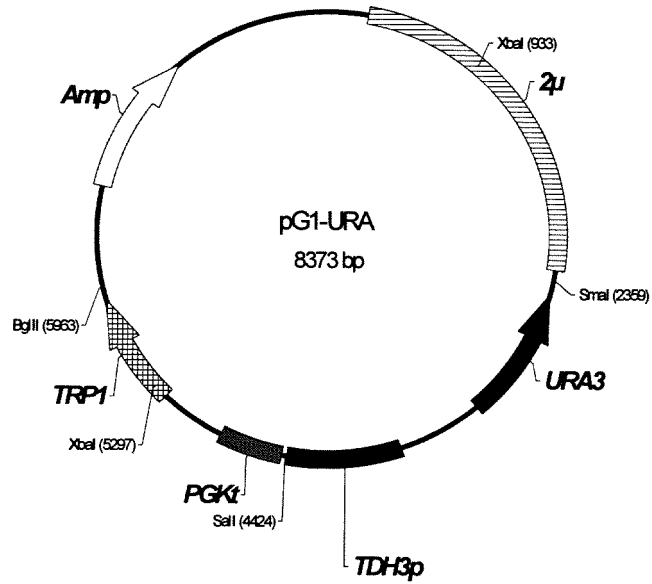


Figura 1B

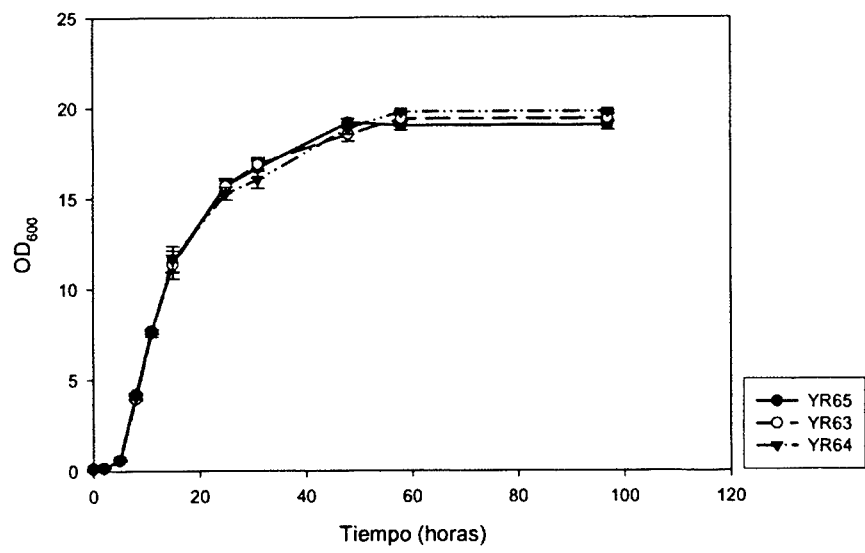


Figura 2A

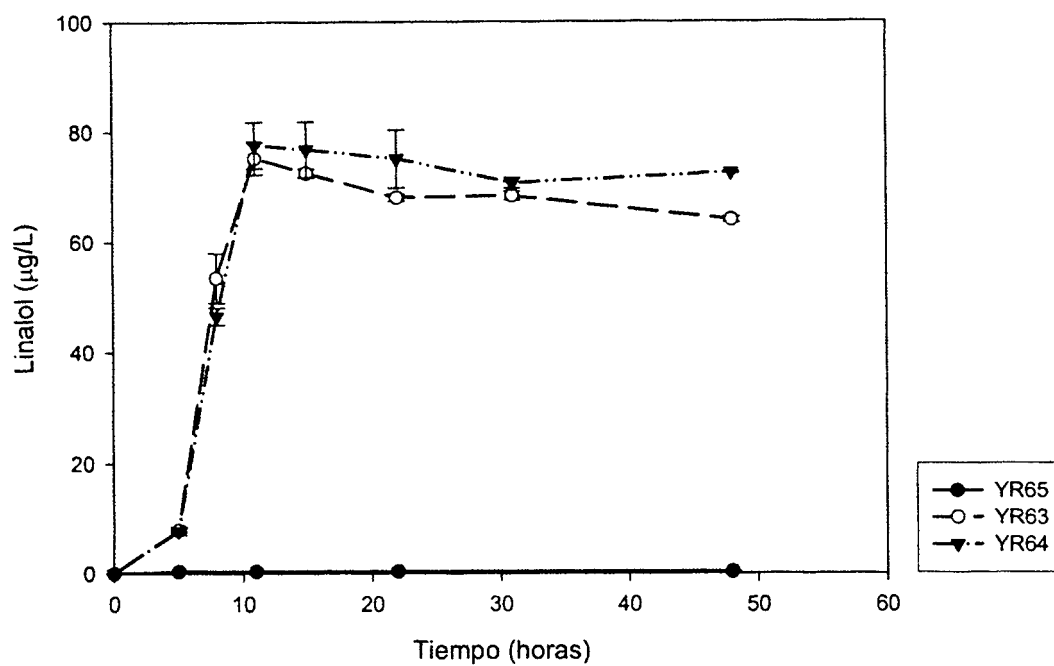


Figura 2B

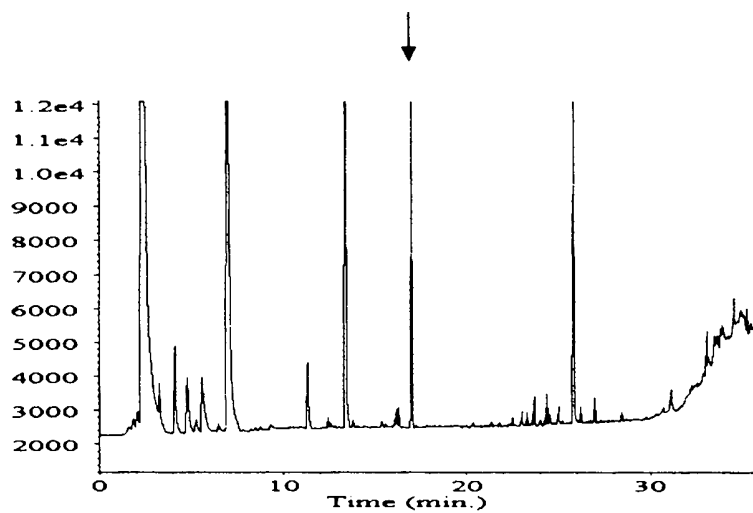


Figura 3A

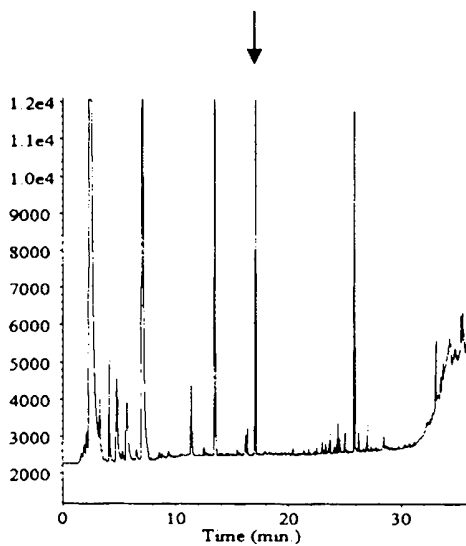


Figura 3B

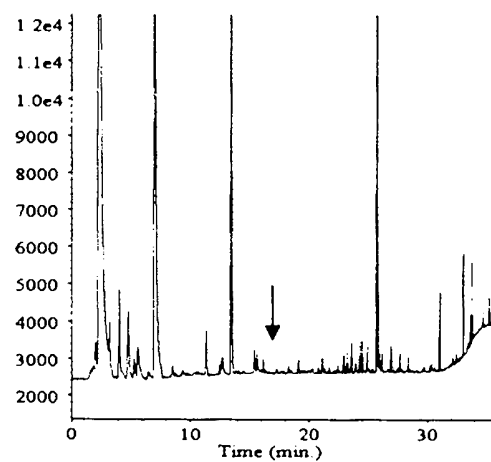


Figura 3C

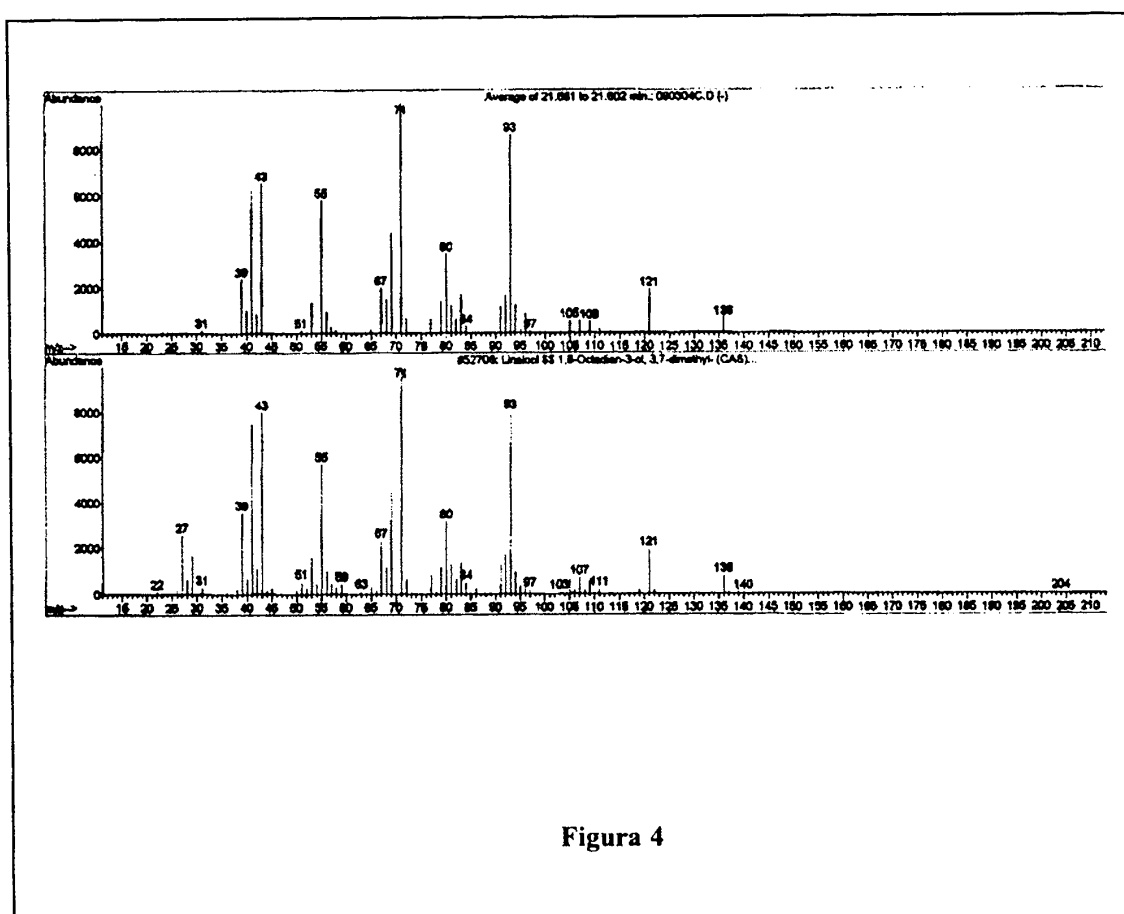


Figura 4

ES 2 324 508 B1

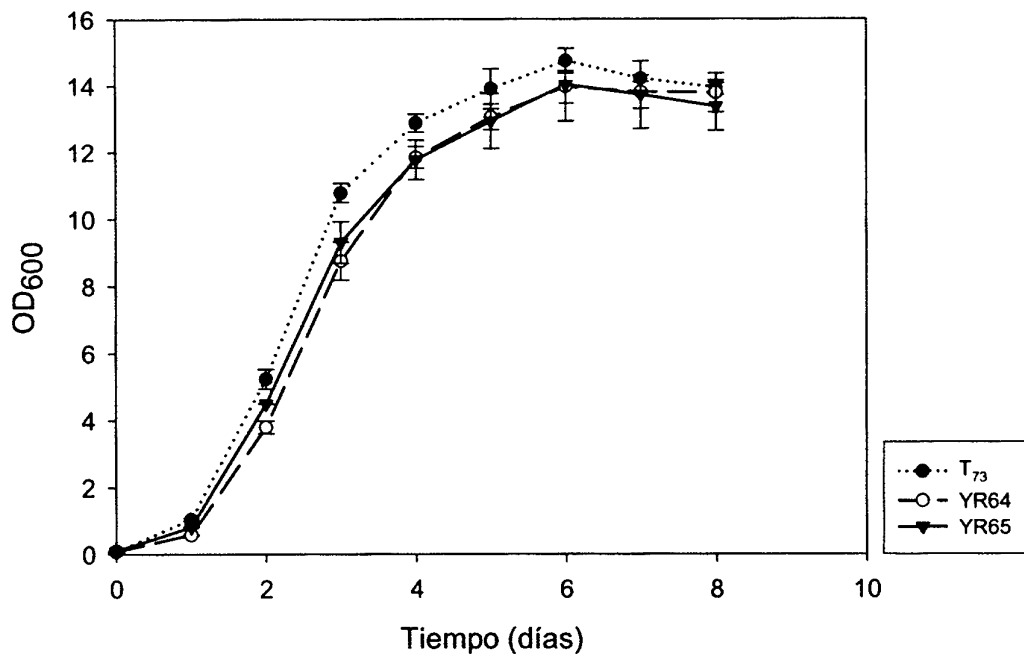


Figura 5A

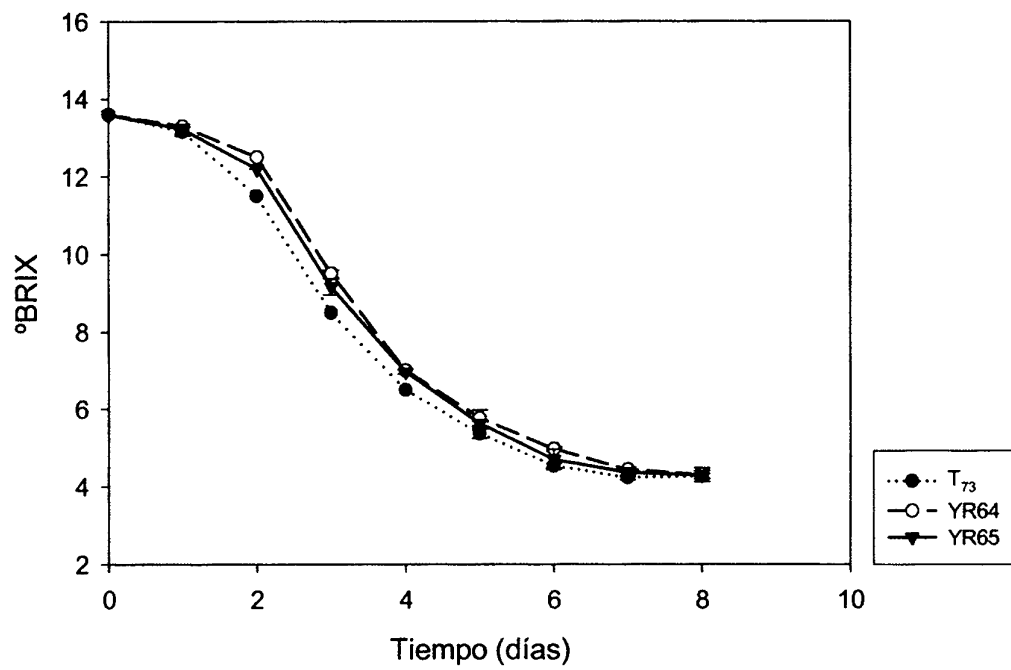


Figura 5B

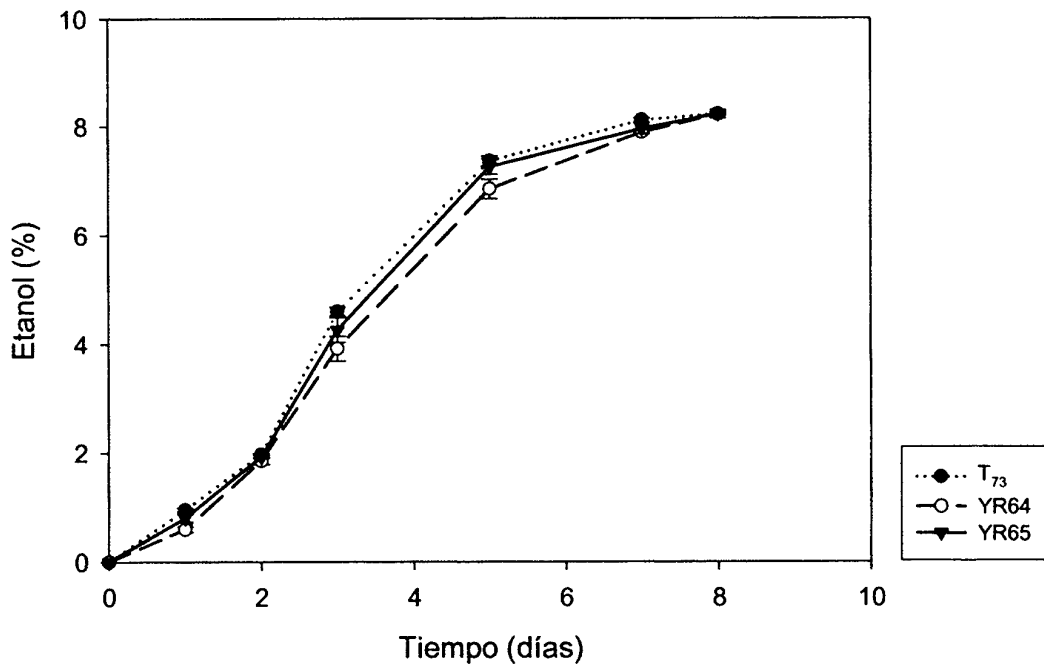


Figura 5C

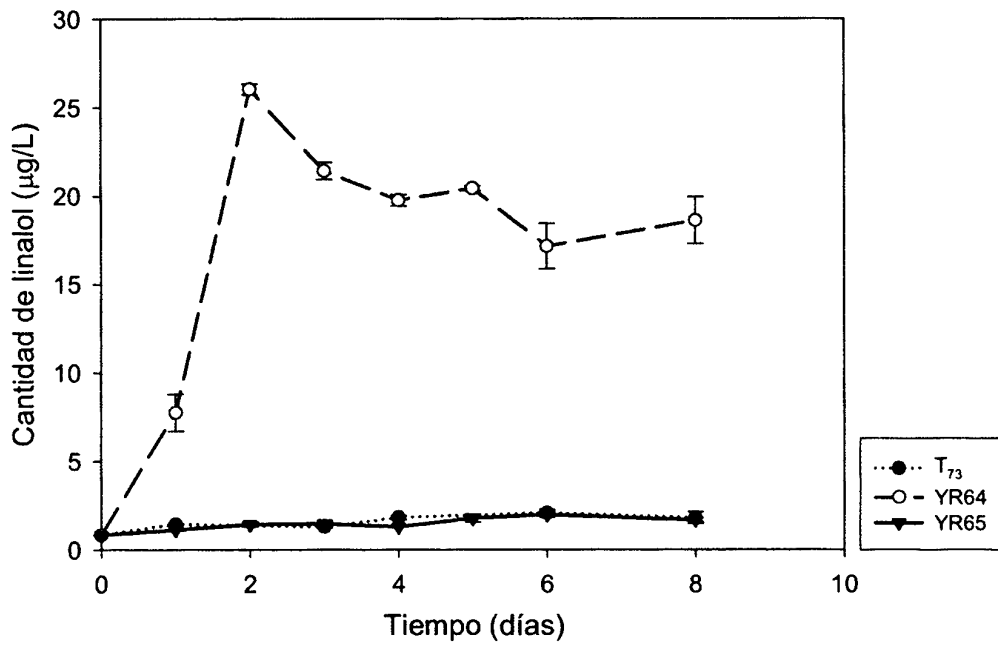


Figura 5D

ES 2 324 508 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo superior de Investigaciones Científicas
Orejas, Margarita
5 Ramón, Daniel
Herrero, Oscar

<120> Microorganismo productor de monoterpenos, procedimiento de obtención y sus aplicaciones en la fermentación de bebidas alcohólicas
10

<130> S-linalol sintasa

<160> 6
15

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
20 <211> 2725
<212> DNA
<213> *Clarkia breweri*

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(6)

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (641)..(648)

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (2719)..(2725)

40 <400> 1

agatctggta ccaccttaa caagacaacc atgcagctca taacaaattt ctcatcatca	60
45 tcatcagaat tgcagtttct tgtggataag gttaagagag aatcattgct ttcttcatca	120
tctaatactc agaatttggt tctctcaact tcaccttatg acaccgcttg gctcgcctt	180
atccctcatc ctcatcatca ccatcaccat ggccgacca tgtttgaaaa atgtctgcaa	240
50 tggattctcc ataaccagac accacaaggt ttctgggcag cagctgggga caatatttcc	300
gacaccgacg atgacgtcac cctggattgt cttctatcaa ccttggcttg cttagttgca	360
ctcaaaaggt ggcagcttgc tcccgacatg attcataaag gattggaatt tgtacataga	420
55 aacacagaga gacttgtaat gaagcagaag ccgagcgacg ttctctgctg gttcaccatc	480
atgttcccgg cgatgctcga gcttgccgga gcttccagtc tccgagtcga tttcagcgag	540
aatcttaaca gaatcttggt ggaactatct caaaataggg atgatattct cacaagggag	600
60 gaagttgatg agaagaagca atactcacca ttgctactat ttctagaagc attgcctgca	660
caatcctatg acaatgatgt tctaaagcaa attatagaca agaacttgag caatgatggt	720
tctttattcc aatcgccttc tgctacagca agagcataca tgataacagg aaataccaga	780
65 tgcttatcgt atctacactc tttaacaaat agctgctcta atggaggagt accatcattc	840
tatcctgctg acgacgacct ccatgatctt gtcattggtga atcaactgac aaggctcgggt	900
ttgactgaac atctcatccc ggagattgac caccttctac tcaaagttca aaagaactac	960

ES 2 324 508 B1

aaatacaaaa aagcatcacc aaaatcattg tatagcattg ctgcggaact atacagggat 1020
 tcattagcat tttggttgct tcgagtcaat aatcactggg tatcaccatc aatTTTTTgt 1080
 5 tggTTTTtag atgacgacga aatccgtgat cacatcgaaa caaactacga ggaatttgct 1140
 gccgtgcttc ttaatgtgta tcgagctacc gatcttatgt tctccggcga agtccaactt 1200
 gtcgaagcaa gatctttcgc taccaagaat cttgagaaaa tattagcaac aggaaacata 1260
 10 cataaaaacta atgcagatat ctcatctagt ttgcataaga tgatcgaaca cgaactaaga 1320
 gttccttggg ccgcaagaat ggacatggt gaaaatcga tttggatcga agaaatagct 1380
 15 tccagtgctt tatggtttgg aaaatcatcc taccttaggt tatcttgctt tcacaagatg 1440
 agtttacagc aactcgcggt gaaaaattat acgcttcgac aattggttta ccgagacgag 1500
 cttgcggaag ttgagaggty gtctaaagaa agagggctat gtgacatggg atttttaga 1560
 20 gagaaaaccg ggtattgtta ctacgcattt gcggcaagta cttgtctgcc gtggagtcc 1620
 gacgtgaggc tggcctgac caaggcggca gttgtcatta cagtggccga tgatttcttt 1680
 gatgtcgaag gatctatggt tgatctcga aaattaacgg atgcagttcg gaggtgggat 1740
 25 gcggaagggt taggcagcca cagcaagaca atatttgaag ccctggatga tcttgtaa 1800
 gaagttagac tcaagtgtt ccaacaaaat ggacaagaca tcaaaaacaa tctccaacaa 1860
 30 ttatggtatg aacattcca tcatggctt atggaagcta agtggggaaa ggggttaaca 1920
 agtaaaccat ctgtagatgt gtatcttggg aatgcaatga catccatagc agctcacacc 1980
 atggtcctta cagcatcctg tcttctaggt cccggttcc cggttcacca actatggctg 2040
 35 caaaggcgcc accaggacat tacatccttg ctcatggtct tgactcgctt gctaaatgac 2100
 attcaatcct acttgaaga agaagacgaa ggaaaaataa actatgtatg gatgtacatg 2160
 40 atcgagaaca atcaagcgtc gatagatgac tcggttcgac acgtccagac gataatcaat 2220
 gtaaaaaagc aagaattcat ccaacgtgtt ctatcggatc aacattgcaa tctcccaaag 2280
 tcattcaagc agctccattt ctctgcctc aaagtattca acatgttctt caactcctcc 2340
 45 aacattttcg aactgatac cgaccttctt cttgacattc acgaagcttt tgtttctcca 2400
 ccacaagttc ccaaattcaa accccacatc aagccacctc atcagcttcc agcaacactt 2460
 50 cagccacctc atcagcccca acaataatg gtcaataaga agaagggtga aatggtttac 2520
 aaaagctatc atcatccatt caaggttttc accttgaga agaaacaaag ttcgggacat 2580
 ggtacaatga atccaagggc tagtatctta gcaggacca acatcaaact atgtttcagt 2640
 55 taacgaatac actaccttgt tattagaaga tgtcaccagt ttccctcgtg ccgaattcga 2700
 tatcaagctt atcgataccg tcgac 2725

60 <210> 2
 <211> 870
 <212> PRT
 <213> *Clarkia breweri*
 65 <220>
 <221> VARIANT

ES 2 324 508 B1

<222> (129)..(129)

<220>

5 <221> VARIANT

<222> (233)..(233)

<400> 2

```

10      Met Gln Leu Ile Thr Asn Phe Ser Ser Ser Ser Ser Glu Leu Gln Phe
      1          5          10          15
15      Leu Val Asp Lys Val Lys Arg Glu Ser Leu Ser Ser Ser Ser Ser Asn
      20          25          30
20      Thr Gln Asn Leu Phe Leu Ser Thr Ser Pro Tyr Asp Thr Ala Trp Leu
      35          40          45
25      Ala Leu Ile Pro His Pro His His His His His His Gly Arg Pro Met
      50          55          60
30      Phe Glu Lys Cys Leu Gln Trp Ile Leu His Asn Gln Thr Pro Gln Gly
      65          70          75          80
35      Phe Trp Ala Ala Ala Gly Asp Asn Ile Ser Asp Thr Asp Asp Asp Val
      85          90          95
40      Thr Leu Asp Cys Leu Leu Ser Thr Leu Ala Cys Leu Val Ala Leu Lys
      100         105         110
45      Arg Trp Gln Leu Ala Pro Asp Met Ile His Lys Gly Leu Glu Phe Val
      115         120         125
50      His Arg Asn Thr Glu Arg Leu Val Met Lys Gln Lys Pro Ser Asp Val
      130         135         140
55      Pro Arg Trp Phe Thr Ile Met Phe Pro Ala Met Leu Glu Leu Ala Gly
      145         150         155         160
60      Ala Ser Ser Leu Arg Val Asp Phe Ser Glu Asn Leu Asn Arg Ile Leu
      165         170         175
65      Val Glu Leu Ser Gln Asn Arg Asp Asp Ile Leu Thr Arg Glu Glu Val
      180         185         190
70      Asp Glu Lys Lys Gln Tyr Ser Pro Leu Leu Leu Phe Leu Glu Ala Leu
      195         200         205
75      Pro Ala Gln Ser Tyr Asp Asn Asp Val Leu Lys Gln Ile Ile Asp Lys
      210         215         220
80      Asn Leu Ser Asn Asp Gly Ser Leu Phe Gln Ser Pro Ser Ala Thr Ala
      225         230         235         240

```

ES 2 324 508 B1

Arg Ala Tyr Met Ile Thr Gly Asn Thr Arg Cys Leu Ser Tyr Leu His
 245 250 255
 5 Ser Leu Thr Asn Ser Cys Ser Asn Gly Gly Val Pro Ser Phe Tyr Pro
 260 265 270
 10 Val Asp Asp Asp Leu His Asp Leu Val Met Val Asn Gln Leu Thr Arg
 275 280 285
 15 Ser Gly Leu Thr Glu His Leu Ile Pro Glu Ile Asp His Leu Leu Leu
 290 295 300
 20 Lys Val Gln Lys Asn Tyr Lys Tyr Lys Lys Ala Ser Pro Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 25 Tyr Ser Ile Ala Ala Glu Leu Tyr Arg Asp Ser Leu Ala Phe Trp Leu
 325 330 335
 30 Leu Arg Val Asn Asn His Trp Val Ser Pro Ser Ile Phe Cys Trp Phe
 340 345 350
 35 Leu Asp Asp Asp Glu Ile Arg Asp His Ile Glu Thr Asn Tyr Glu Glu
 355 360 365
 40 Phe Ala Ala Val Leu Leu Asn Val Tyr Arg Ala Thr Asp Leu Met Phe
 370 375 380
 45 Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ala Arg Ser Phe Ala Thr Lys Asn
 385 390 395 400
 50 Leu Glu Lys Ile Leu Ala Thr Gly Asn Ile His Lys Thr Asn Ala Asp
 405 410 415
 55 Ile Ser Ser Ser Leu His Lys Met Ile Glu His Glu Leu Arg Val Pro
 420 425 430
 60 Trp Thr Ala Arg Met Asp His Val Glu Asn Arg Ile Trp Ile Glu Glu
 435 440 445
 65 Ile Ala Ser Ser Ala Leu Trp Phe Gly Lys Ser Ser Tyr Leu Arg Leu
 450 455 460
 70 Ser Cys Phe His Lys Met Ser Leu Gln Gln Leu Ala Val Lys Asn Tyr
 465 470 475 480
 75 Thr Leu Arg Gln Leu Val Tyr Arg Asp Glu Leu Ala Glu Val Glu Arg
 485 490 495
 80 Trp Ser Lys Glu Arg Gly Leu Cys Asp Met Gly Phe Cys Arg Glu Lys
 500 505 510

ES 2 324 508 B1

Thr Gly Tyr Cys Tyr Tyr Ala Phe Ala Ala Ser Thr Cys Leu Pro Trp
 515 520 525
 5 Ser Ser Asp Val Arg Leu Val Leu Thr Lys Ala Ala Val Val Ile Thr
 530 535 540
 10 Val Ala Asp Asp Phe Phe Asp Val Glu Gly Ser Met Val Asp Leu Glu
 545 550 555
 15 Lys Leu Thr Asp Ala Val Arg Arg Trp Asp Ala Glu Gly Leu Gly Ser
 565 570 575
 20 His Ser Lys Thr Ile Phe Glu Ala Leu Asp Asp Leu Val Asn Glu Val
 580 585 590
 25 Arg Leu Lys Cys Phe Gln Gln Asn Gly Gln Asp Ile Lys Asn Asn Leu
 595 600 605
 30 Gln Gln Leu Trp Tyr Glu Thr Phe His Ser Trp Leu Met Glu Ala Lys
 610 615 620
 35 Trp Gly Lys Gly Leu Thr Ser Lys Pro Ser Val Asp Val Tyr Leu Gly
 625 630 635 640
 40 Asn Ala Met Thr Ser Ile Ala Ala His Thr Met Val Leu Thr Ala Ser
 645 650 655
 45 Cys Leu Leu Gly Pro Gly Phe Pro Val His Gln Leu Trp Ser Gln Arg
 660 665 670
 50 Arg His Gln Asp Ile Thr Ser Leu Leu Met Val Leu Thr Arg Leu Leu
 675 680 685
 55 Asn Asp Ile Gln Ser Tyr Leu Lys Glu Glu Asp Glu Gly Lys Ile Asn
 690 695 700
 60 Tyr Val Trp Met Tyr Met Ile Glu Asn Asn Gln Ala Ser Ile Asp Asp
 705 710 715 720
 65 Ser Val Arg His Val Gln Thr Ile Ile Asn Val Lys Lys Gln Glu Phe
 725 730 735
 70 Ile Gln Arg Val Leu Ser Asp Gln His Cys Asn Leu Pro Lys Ser Phe
 740 745 750
 75 Lys Gln Leu His Phe Ser Cys Leu Lys Val Phe Asn Met Phe Phe Asn
 755 760 765
 80 Ser Ser Asn Ile Phe Asp Thr Asp Thr Asp Leu Leu Leu Asp Ile His
 770 775 780

ES 2 324 508 B1

5 Glu Ala Phe Val Ser Pro Pro Gln Val Pro Lys Phe Lys Pro His Ile
 785 790 795 800

 10 Lys Pro Pro His Gln Leu Pro Ala Thr Leu Gln Pro Pro His Gln Pro
 805 810 815

 15 Gln Gln Ile Met Val Asn Lys Lys Lys Val Glu Met Val Tyr Lys Ser
 820 825 830

 20 Tyr His His Pro Phe Lys Val Phe Thr Leu Gln Lys Lys Gln Ser Ser
 835 840 845

 25 Gly His Gly Thr Met Asn Pro Arg Ala Ser Ile Leu Ala Gly Pro Asn
 850 855 860

 30 Ile Lys Leu Cys Phe Ser
 865 870

25 <210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> LisBg12

35 <400> 3

cggaagatct ggtaccacct taaacaagac

30

40 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> LisXba1

50 <400> 4

aggcaatgct tctagaaata g

21

55 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> URA1

65 <400> 5

aatgtggctg tggtttcagg g

21

ES 2 324 508 B1

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> URA4

10

<400> 6

ggcgaggat tggatagtc c

21

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 324 508

② Nº de solicitud: 200603283

③ Fecha de presentación de la solicitud: 27.12.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WO 1992016611 A1 (PERNOD-RICARD) 01.10.1992, todo el documento.	1-12
Y	DUDAREVA, N., CSEKE, L., BLANC, V. M., PICHESKY, E. Evolution of floral scent in Clarkia: novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the C. breweri flower. The Plant Cell. Julio 1996, Vol. 8, Nº 7, páginas 1137-1148. ISSN 1040-4651.	1-12
Y	CARRAU, F. M., MEDINA, K., BOIDO, E. et al. De novo synthesis of monoterpenes by Saccharomyces cerevisiae wine yeast. FEMS Microbiology Letters. Febrero 2005, Vol. 243, Nº 1, páginas 107-115. ISSN 0378-1097.	1-12
Y	WO 1997015584 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 01.05.1997, páginas 1-4; página 12, líneas 16-31; página 15, líneas 7-13; página 19, líneas 26-37; página 23, línea 35 - página 24, línea 2; página 27, líneas 19-30; página 56, línea 18 - página 59, línea 24.	1-12

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

24.07.2009

Examinador

E. Relaño Reyes

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

C12G 1/022 (2006.01)