



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 328 323**

② Número de solicitud: 200703243

⑤ Int. Cl.:
C12N 15/56 (2006.01)
C12N 15/76 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **05.12.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **11.11.2009**

Fecha de la concesión: **30.09.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **18.10.2010**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
18.10.2010

⑰ Titular/es: **Universidad de Castilla-La Mancha
Campus Universitario-Pabellón de Gobierno
Plaza de la Universidad, 2
02071 Albacete, ES**

⑱ Inventor/es: **Fernández González, Mónica;
Briones Pérez, Ana Isabel y
Úbeda Iranzo, Juan**

⑳ Agente: **Carpintero López, Francisco**

⑳ Título: **Cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* CECT 11783, modificada genéticamente con actividad pectinolítica: su método de obtención y aplicación.**

㉑ Resumen:

Cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* CECT 11783, modificada genéticamente con actividad pectinolítica: su método de obtención y aplicación.

Cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* CECT 11783 modificada genéticamente capaz de expresar y secretar en, cantidades comercialmente útiles una endopoligalacturonasa, para su empleo en la industria de alimentos y bebidas. Para lograr este objetivo, se incluyó en el genoma de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* el fragmento lineal de DNA de secuencia definida con el gen que codifica para la endopoligalacturonasa (PGU1) unido en fusión transcripcional al promotor del gen de la fosfogliceratoquinasa (PGK1) ambos de origen *Saccharomyces cerevisiae*, desprovistos de secuencias bacterianas o de cualquier otro organismo distinto al citado.

Esta cepa puede ser empleada para sintetizar la enzima y posteriormente purificarla y adiccionarla a los zumos de frutas para mejorar la clarificación y el rendimiento en la extracción, o bien, como ocurre en los productos fermentados, que la levadura produzca la enzima directamente durante el proceso, sin necesidad de ser adicionada al medio.

ES 2 328 323 B1

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

DESCRIPCIÓN

Cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* CECT 11783, modificada genéticamente con actividad pectinolítica: su método de obtención y aplicación.

5 **Sectores de la técnica**

Técnicas de ingeniería genética. Fabricación de alimentos y bebidas. Levaduras vínicas.

10 **Estado de la técnica**

15 Las pectinas son heteropolisacáridos, y los principales constituyentes de la lámina media y pared primaria celular de las plantas superiores. Son las responsables de la integridad y coherencia de los tejidos vegetales y además de su función como agentes lubricantes y cementantes, están involucradas en las interacciones entre la planta el ataque de patógenos (Van Rensburg y Pretorius, 2000).

En la industria alimentaria, las pectinas pueden originar problemas, durante la extracción, filtración y clarificación de los zumos de frutas, por la turbidez y viscosidad que comunican a los mismos.

20 En vinificación se utilizan las pectinasas para mejorar los rendimientos de extracción de mosto por degradación de los polisacáridos estructurales que interfieren en la extracción (Sims *et al.*, 1988), para aumentar la liberación de compuestos del color y del aroma en los mostos antes y durante la fermentación y la maceración, así como, para facilitar la clarificación y filtración de los vinos (Villetaz, 1990, 1996 y Servili *et al.*, 1992).

25 Las enzimas pectinolíticas se encuentran principalmente en los mohos y en las bacterias, pero también están presentes en algunas levaduras. Debido al papel desempeñado por las levaduras, especialmente del género *Saccharomyces*, en los productos fermentados, es interesante profundizar en el estudio de sus enzimas pectinolíticas con dos objetivos: o bien utilizar la levadura para sintetizar las enzimas y posteriormente purificarlas y adicionarlas a los zumos de frutas para favorecer así la clarificación y la extracción o bien, como ocurre en los productos fermentados, que la levadura produzca la enzima directamente durante el proceso, sin necesidad de ser adicionada al medio.

30 La mayoría de los preparados comerciales de pectinasas usados en la industria de los alimentos, proceden de *Aspergillus Níger*, que además de producir grandes cantidades de estas enzimas es considerado un microorganismo GRAS (Generally Recognized as Safe). Sin embargo este moho secreta, otras menos deseables en la producción de vino o de zumos de frutas, como por ejemplo la arabinofuranosidasa que puede causar turbidez (Whitaker, 1984).

35 La capacidad de *S. cerevisiae* para degradar el ácido poligalacturónico podría tener importantes consecuencias en la fermentación de sustratos derivados de plantas ya que se han encontrado cepas que poseen la capacidad para degradarlo (Mc Kay, 1990). Gainvors *et al.* (1994a) encontraron que la cepa SCPP, recientemente identificada como *S. bayanus*, (Naumov *et al.* 2001) producía tres tipos de enzimas pectinolíticas, pectin metil esterasa, pectin liasa y poligalacturonasa y además demostraron (Gainvors *et al.*, 1994b) que cuando a un mosto fresco se le adicionaba el extracto enzimático de dicha cepa, se obtenían los mismos resultados sobre la turbidez, que cuando se añadía una preparación enzimática comercial (Endozyme[®]).

40 Blanco *et al.* (1997) observaron que al vinificar con cepas *S. cerevisiae* PG+, en algunos casos se reducía el tiempo de filtración en un 50% aproximadamente, sin obtener cambios apreciables en la viscosidad.

45 Probablemente el principal problema de utilizar enzimas pectinolíticas de levaduras en el procesado industrial, reside en los bajos rendimientos de actividad en la fermentación; por lo que una alternativa sería clonar y sobreexpresar los genes estructurales responsables de estas actividades enzimáticas, obteniendo así una cepa de levadura vínica que facilitara la clarificación del mosto y del vino durante la fermentación con la consiguiente ventaja económica. Estas cepas podrían además incrementar el color y el aroma de los vinos (Van Rensburg y Pretorius, 2000).

50 La presente invención se refiere a la transformación de la cepa vínica UCLMS-1 con buenas cualidades enológicas con el gen PGU1 procedente de la cepa UCLMS-29, unida en fusión transcripcional al promotor del gen PGK1 con el fin de incrementar su expresión durante el proceso de vinificación. La primera referencia a este promotor fue publicada en 1987 (Clive Stanway *et al.* "The UAS of the yeast PGK gene contains functionally distinct domains". *Nucleic Acids Research. Volume 15, number 17, 1987*) y su secuencia de nucleótidos, que está localizada en el cromosoma III de *Saccharomyces cerevisiae* (NC_001135), fue publicada el 24 de abril de 1996 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=85666111; range from 137164-137743>); (http://www.yeastgenome.org/archive/sequence_done.shtml).

55 Se realizaron ensayos de microvinificación tanto en mosto blanco como en tinto, con la cepa transformadora CECT 11783, y con la misma cepa sin transformar, comparándose los resultados obtenidos.

60 **Breve descripción de la figura**

Figura 1. Esquema de la transformación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (UCLMS-1) con actividad endopoligalacturonasa.

Explicación de la invención

La presente invención se relaciona con la rama de la Biotecnología y la Ingeniería Genética, y en particular con una nueva cepa de levadura modificada genéticamente productora de una endopoligalacturonasa, así como con el procedimiento para su obtención.

El objetivo técnico que persigue la misma es la obtención de una cepa de levadura capaz de expresar y excretar en cantidades comercialmente útiles esta enzima con actividad pectinolítica, para su empleo en la industria de alimentos y bebidas.

Para lograr este objetivo se incluyó en el genoma de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* UCLMS-1 con buenas propiedades enológicas el gen que codifica para la endopoligalacturonasa (PGU1) (SEQ ID NO 1) unido en fusión transcripcional al promotor del gen de la fosfogliceratoquinasa (PGK1) (PGK1p) (SEQ ID NO 2) proveniente de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* UCLMS-39, obteniéndose una cepa hiperproductora de la enzima durante el proceso de fermentación, mejorando considerablemente el rendimiento de extracción de mosto/zumo a partir de la materia prima. Esta cepa ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con la referencia CECT 11783, con sede en la Universidad de Valencia, la que ostenta la categoría de Autoridad de Depósito autorizada según el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes.

Modo de realización de la invención

La invención consiste en el desarrollo de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* con buenas propiedades enológicas, capaz de producir pectinasas durante la fermentación alcohólica. Para ello se seleccionó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* con actividad endopoligalacturonásica, cuyo gen PGU1 (SEQ ID NO 1) era funcional bajo su propio promotor y bajo el promotor GAL1, y con el fin de incrementar sus niveles de expresión, en condiciones fermentativas, se sustituyó el promotor nativo del gen **PGU1** (SEQ ID NO 1) por el promotor de expresión fuerte del gen PGK1 (3-fosfoglicerato quinasa) (**PGK1p**) (SEQ ID NO 2) de *S. cerevisiae*. Su secuencia contenía una mutación en el nucleótido 877 (A→G) que le confería el cambio de un aminoácido (Ser 293→Gly) de los 361 que constituían la proteína, comparada con la encontrada en la base de datos para la cepa S288C (correspondiente a ORF YJR 153W, localizada en el cromosoma X).

En una primera reacción de amplificación (**PCR1**), se amplificó un fragmento de DNA que portaba el promotor del gen PGK1, nt-580 a +3, en el extremo 5' las secuencias de reconocimiento para las enzimas NcoI y BamHI y en el extremo 3' una porción correspondiente al principio de la zona codificante del gen PGU1, nt +1 a+22, utilizando los oligonucleótidos **5'-PGK1p** (SEQ ID NO 4) y **R-PGU1-PGK1p** (SEQ ID NO 5).

Por otra parte se amplificó en otra mezcla de reacción (**PCR2**), la zona codificante del gen PGU1, nt +1 a +1086, en el extremo 5' una porción de la secuencia correspondiente al promotor del gen PGK1, nt-13 a +3, y en el 3' la secuencia de reconocimiento de la enzima BamHI, utilizando los oligonucleótidos **F-PGK1p-PGU1** (SEQ ID NO 6) y **CT-PGU1** (SEQ ID NO 7).

En una tercera reacción (**PCR3**), se obtuvo un fragmento de DNA que portaba la secuencia del promotor del gen PGK1, nt-580 a +3, fusionada a la región codificante del gen PGU1, nt +1 a +1086, utilizando los oligonucleótidos **5'GK1p** (SEQ ID NO 4) y **CT-PGU1** (SEQ ID NO 7) anteriormente citados.

El fragmento obtenido mediante PCR3 se trató con BamHI, se purificó con GeneClean II, se ligó utilizando T4 DNA ligasa al plásmido YCp50, previamente linealizado con BamHI, transformando a continuación *E. coli* DH5 α con el plásmido formado. Las construcciones se chequearon mediante restricción y **PCR4**.

El DNA plasmídico extraído de los transformadores DH5 α con la construcción de interés, se usó para transformar *S. cerevisiae* W3031b, seleccionando por el fenotipo Ura⁺, y después por PG+.

Construcción de la cepa de *S. cerevisiae* vínica CECT 11783 con actividad pectinolítica

Con el fin de obtener una cepa de levadura vínica capaz de hidrolizar las pectinas durante el proceso de vinificación, se incluyó en el genoma de *S. cerevisiae* UCLMS-1 el gen que codifica para la endopoligalacturonasa (PGU1) (SEQ ID NO 1), procedente de la cepa *S. cerevisiae* UCLMS-39, unido en fusión transcripcional al promotor de la fosfoglicerato quinasa (**PGK1p**) (SEQ ID NO 2) obtenido de la misma cepa, y descrito en el apartado anterior.

La estrategia seguida fue la integración dirigida al locus *ILV2* (*SMR1*, *THI1*), ORF YMR108W, en el cromosoma XIII, que codifica para la biosíntesis de la enzima acetolactato sintasa (ALS) y que permite la utilización del herbicida sulfometurón metil (**SMR1**) como marcador de selección (Falco *et al.*, 1985). Este marcador se ha utilizado en la transformación de algunas levaduras industriales (Gasent-Ramírez, *et al.*, 1995, Marin *et al.*, 2001).

Por ello se utilizó el vector integrativo Pwx509 (Casey *et al.*, 1988), al que se le insertó la construcción pPGK1-PGU1 (SEQ ID NO 3), usando el sitio BamHI. Este fragmento se trató con Klenow para obtener extremos no cohesivos, subclonarse en el sitio SnaBI del vector pWX509. A continuación se transformó *E. coli* seleccionando aquellos Ap^R.

ES 2 328 323 B1

El DNA plasmídico una vez extraído y comprobada que poseían la construcción de interés (pKUSa), se trató con *Sall*, y la levadura vínica se transformó con el fragmento lineal así obtenido, conteniendo la región SMR1, el cassette pPGK1-PGU1 (SEQ ID NO 3), y las secuencias en los flancos 5' y 3' del locus SMR1, seleccionando por resistencia a sulfometuron (SMMR). Una vez transformada la levadura, se comprobó que expresaba la actividad poligalacturonásica y que contenía el inserto de interés mediante PCR4. En la Figura 1, se detalla el procedimiento seguido para la obtención de esta cepa.

El cassette expresado en la cepa UCLMS-1 dio lugar a otra, CECT 11783 motivo de la invención, es de origen *S. cerevisiae*, siendo un organismo genéticamente modificado, pero no transgénico, ya que no contiene ninguna secuencia de fago o bacteria.

Ensayos de Microvinificación

Se llevaron a cabo microvinificaciones por quintuplicado de mosto blanco y tinto siguiendo el procedimiento tradicional para la elaboración de estos vinos. Como cultivos iniciadores se usaron las levaduras *S. cerevisiae* CECT 11783 y la misma cepa sin modificar, que se empleó como control.

El mosto blanco se obtuvo de uvas de la variedad Airén y el tinto, de uvas de la variedad Cencibel, conservados a -20°C, hasta su uso. Los mostos, se adicionaron de 30ppm de SO₂ y se utilizaron tanto para la preparación del inóculo como para las microvinificaciones. Estas se llevaron a cabo en matraces de 1L provistos de válvulas Müller y se inocularon con una concentración 10⁷ clas/mL Para cada tipo de elaboración se observó un comportamiento cinético similar independiente de la cepa de levadura usada y mostraron una adecuada viabilidad celular, obteniéndose recuentos propios en este tipo de procesos.

Respecto a la implantación de los cultivos, todos los aislados analizados presentaron idéntico perfil de restricción del DNA mitocondrial al de los cultivos iniciadores, y los aislados procedentes de las microvinificaciones con la cepa CECT 11783, mostraron actividad poligalacturonásica.

A los vinos obtenidos, se les analizaron los parámetros convencionales, como la acidez volátil, el pH, los azúcares reductores, el grado alcohólico, así como la intensidad colorante y la tonalidad en los vinos tintos. Cuando se aplicó el análisis estadístico (t-student para muestras relacionadas), se observó que para los vinos blancos no existieron diferencias significativas (p<0,05) para ninguno de los parámetros físico-químicos estudiados. Sin embargo, para los vinos tintos elaborados con la cepa CECT 11783 (TM) la cantidad de azúcares reductores, fue significativamente superior (p<0,05) con respecto al control (TC). Estos resultados son lógicos, teniendo en cuenta que la maceración con este tipo de enzimas da lugar a la hidrólisis lenta de las paredes celulares de los hollejos, aumentando el contenido de polisacáridos pécticos enzima-resistentes como el RG-1, que pueden incrementar el poder reductor (Pellerin, 2001); no obstante y como dato relevante, no existieron diferencias significativas en el grado alcohólico. Además el TM tuvo mayor intensidad colorante, y tonalidad roja, hecho muy valorado en las fermentaciones de vino tinto, sin embargo, el TC presentó mayor tonalidad.

Se midió la velocidad de filtración, la viscosidad y el rendimiento de extracción de semifermentado sólo en los vinos tintos. La gran mejora tecnológica fue la mayor extracción de semifermentado a partir de las uvas tintas en los vinos elaborados con la cepa CECT 11783, obteniéndose un 7% más de rendimiento con respecto al control, debido a que la enzima secretada, facilitó la ruptura de las paredes celulares de las uvas, favoreciendo además la extracción de antocianos a partir de los antocianoplastos (Rogerson *et al.*, 2000), responsables del incremento de la intensidad colorante. Respecto al tiempo de filtración y la viscosidad cinemática, no se observaron diferencias significativas entre los vinos elaborados con ambas cepas.

Mediante cromatografía de gases se determinó el contenido en acetaldehído, metanol, 1-propanol, 2-butanol, isobutanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, y acetato de etilo. En los vinos blancos no se obtuvo ninguna diferencia significativa en los compuestos analizados, sin embargo, en los tintos se produjo un incremento en la concentración de metanol en los elaborados con la cepa CECT 11783, lo cuál es lógico debido a la degradación de las pectinas de la uva. Sin embargo, estos valores se encontraron por muy por debajo del valor máximo permitido en la legislación (500 mg/L).

Con el fin de conocer si existían diferencias sensorialmente significativas, entre los distintos vinos, se realizó una prueba triangular con los vinos elaborados con las dos cepas. Los datos estadísticos mostraron que no existieron diferencias significativa entre ellos (p<0,05). Por lo tanto, las modificaciones en el contenido en polisacáridos pécticos no tienen ninguna consecuencia directa en el gusto o el sabor del vino.

De los datos expuestos, se deduce que la ventaja principal del uso de cepa modificada, reside sobre todo en un mayor rendimiento de la extracción del mosto-vino, afectando además, positivamente algunas de las variables relacionadas con la apariencia.

Aplicaciones industriales

La cepa CECT 11783 puede ser empleada para sintetizar la enzima y posteriormente purificarla y adiccionarla a los zumos de frutas para favorecer así la clarificación y la extracción, o bien, como ocurre en los productos fermentados, que la levadura produzca la enzima directamente durante el proceso, sin necesidad de ser adicionada al medio.

REIVINDICACIONES

5 1. Cepa de levadura *S. cerevisiae* modificada genéticamente para la hiperproducción de la enzima endopoligalacturonasa **caracterizada** porque comprende en su genoma el gen que codifica para dicha enzima endopoligalacturonasa (PGU1) (SEQ ID NO1) unido en fusión transcripcional al promotor del gen de la fosfogliceratoquinasa (PGK1) (SEQ ID NO2), ambos de origen *S. cerevisiae*.

10 2. Cepa de levadura *S. cerevisiae*, según la reivindicación 1, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el nº de identificación 11783.

3. Uso de una cepa de levadura *S. cerevisiae*, según las reivindicaciones 1 y 2, en la elaboración de bebidas alcohólicas fermentadas.

15 4. Uso de una cepa de levadura *S. cerevisiae*, según la reivindicación 3, en la elaboración del vino.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

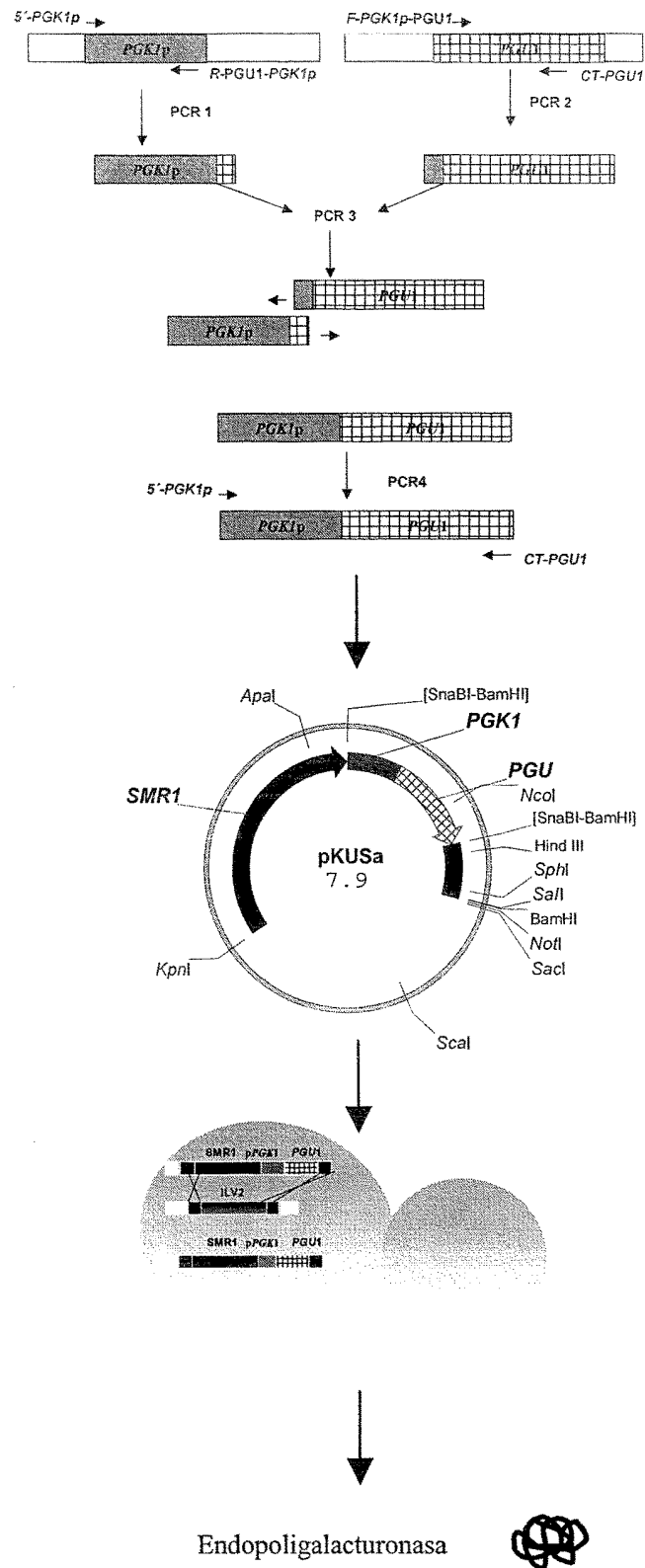


FIGURA 1/1



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 328 323

② N° de solicitud: 200703243

③ Fecha de presentación de la solicitud: 05.12.2007

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
X	M. FERNANDEZ GONZALEZ et al. "Engineering of an oenological <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain with pectinolytic activity and its effect on wine". INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD. MICROBIOLOGY. 2005 Vol. 102, páginas 173-183.	1-4
A	M. VILANOVA, 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.	1-4
A	PILAR BLANCO, C. SIEIRO, N.M. REBOREDO, T.G. VILLA. "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.	1-4
A	ES 2223231 B1 (UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA) 16.02.2005, página 6, líneas 5-21.	1-4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

09.10.2009

Examinador

S. González Peñalba

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/56 (2006.01)

C12N 15/76 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)