

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 472**

51 Int. Cl.:
C12N 1/18 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12P 11/00 (2006.01)
C12G 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07866642 .7**
96 Fecha de presentación: **30.11.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2097511**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.09.2009**

54 Título: **USO DE LEVADURAS MUTANTES URE2 PARA INCREMENTAR LA LIBERACION DE TIOLES VOLÁTILES AROMÁTICOS MEDIANTE LEVADURA DURANTE LA FERMENTACIÓN.**

30 Prioridad:
01.12.2006 EP 06291855

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.01.2012

73 Titular/es:
SARCO
7 RUE FRANC-SANSON, BP 40
33015 BORDEAUX CEDEX, FR y
UNIVERSITE VICTOR SEGALEN BORDEAUX 2

72 Inventor/es:
DUBOURDIEU, DENIS;
THIBON, CECILE;
TOMINAGA, TAKATOSHI y
MARULLO, PHILIPPE

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

ES 2 371 472 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de levaduras mutantes *URE2* para incrementar la liberación de tioles volátiles aromáticos mediante levadura durante la fermentación

5 La reacción se refiere al uso de levaduras mutantes *URE2* para incrementar la liberación de tioles volátiles aromáticos mediante levadura durante la fermentación y su aplicación para mejorar el aroma de productos fermentados, en particular bebidas alcohólicas producidas mediante fermentación de levaduras (vino, sidra, cerveza), así como para desarrollar cepas iniciadoras de levaduras con capacidades de liberación de tiol volátil optimizadas.

10 Los tioles volátiles son moléculas extremadamente aromáticas que pueden afectar el aroma de numerosas comidas tales como frutas y carne a la brasa (Shankaranarayana *et al.*, Sulphur compounds in flavours. In Food Flavors; Morton, I.D., Macleod, A.J., Eds; Elsevier Science Publishers: Amsterdam, 1982; part A, p. 169-281). Diversos compuestos de esta familia juegan un papel decisivo en la contribución al aroma de vinos preparados a partir de la variedad de uva Sauvignon blanc (Tominaga *et al.*, J. Agric. Food Chem., 1998c, 46: 5215-5219). Su contribución aromática también se demostró sucesivamente en otras variedades de uva diversas tales como Gewurztraminer, Semillon botritizado, Colombard, Petit-manseng (Tominaga *et al.*, Am. J. Enol. Vitic., 2000a, 51, 178-181) y Merlot (Aznar *et al.*, J. Agric. Food Chem., 2000, 49, 2924-2929). Entre estos compuestos, 4-mercapto-4metilpentan-2-ona (4MMP) (Darriet *et al.*, Flavour Fragr. J., 1995, 10, 385-392; Tominaga *et al.*, 1998c, citado previamente) y 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) (Tominaga *et al.*, Flavour Fragr. J., 1998a, 13, 159-162) se forman principalmente durante la fermentación alcohólica a partir de precursores conjugados de S-cisteína no volátiles inodoros presentes en el mosto (Tominaga *et al.*, J. Int. Sci. Vigne Vin., 1995, 29, 227-232; Tominaga *et al.*, 1998a). La transformación de tales precursores en tioles volátiles se logra mediante metabolismo de levaduras e implica una actividad carbono-azufre β -liasa (Tominaga *et al.*, 1998c; Wakabayashi *et al.*, J. Agric. Food Chem., 2004, 52, 110-116). El acetato de 3-mercaptohexilo (3MHA o A3MH) resultante de la acetilación de 3MH mediante levadura también contribuye al aroma del vino.

25 4MMP, 3MHA y 3MH están caracterizados por descriptores afrutados (boj, maracuyá y pomelo, respectivamente) y presentan umbrales de percepción muy bajos (0,8, 4,2, y 60 ng l⁻¹, respectivamente; Tominaga *et al.*, 1998a). Además, 3MH y 3MHA son moléculas quirales con 2 enantiómeros, R y S. En el vino blanco seco preparado a partir de uvas sanas, 3MH es casi racémico (relación R y S alrededor de 50:50), mientras que 3MHA está mayormente en la forma S (relación R y S alrededor de 30:70). En los vinos preparados a partir de uvas botritizadas (*Botrytis cinerea*), la distribución de enantiómeros de 3MH es de 30:70 a favor de la forma S. Se demostró recientemente que los enantiómeros 3MH(R) y 3MH(S) producían matices aromáticos diferentes (pomelo y maracuyá, respectivamente) con umbrales de percepción similares en solución hidroalcohólica modelo (50 y 60 ng l, respectivamente). Los umbrales de percepción de los enantiómeros R y S de 3MHA son ligeramente diferentes (9 y 2,5 ng/l): la forma R menos odorífera es reminiscente de maracuyá, mientras que la forma S tiene un olor más herbáceo de boj (Tominaga *et al.*, J. Agric. Food Chem., 2006, 54, 7251-7255).

35 Las poderosas propiedades aromáticas de estas moléculas impulsaron estudios recientes para entender cómo puede potenciarse y modularse su producción en la vinificación. Prácticas vitícolas tales como el suministro de nitrógeno (Chone *et al.*, J. Int. Sci. Vigne Vin., 2006, 40, 1-6) y operaciones de prefermentación tales como la maceración pelicular (Peyrot des Gachons *et al.*, Am. J. Enol., Vitic., 2002, 53, 144-156) modulan la cantidad de precursores aromáticos en el mosto de uva. Las condiciones de la fermentación tales como la temperatura (Howell *et al.*, FEMS Microbiol. Letter, 2004, 240, 125-129; Masneuf-Pomarede *et al.*, Int J. Food Microbiol., 2006, 108, 385-390) también influyen la concentración final de estos aromas en el vino. Sin embargo, el factor más importante en la liberación de tiol es indudablemente la cepa de levaduras (Dubourdieu *et al.*, Am. J. Enol. Vitic., 2006, 57, 81-88). Se encontró una fuerte variabilidad (aproximadamente de diez veces) entre las cepas iniciadoras de vino industrial de *S. cerevisiae* (Murat *et al.*, 2001, Am. J. Enol., 52, 136-140; Howell *et al.*, 2004, citado previamente; Masneuf-Pomarede *et al.*, Int. J. Food Microbiol., 2006, 108, 385-390), *S. uvarum*, e híbridos interespecíficos relacionados (Masneuf *et al.*, J. Int. Sci. Vigne Vin, 2002, 36, 205-212). Esta variabilidad indujo programas de rastreo y cría de cepas para obtener nuevas cepas que tienen liberación de tiol más alta (Murat *et al.*, 2001; Masneuf *et al.*, 2002, citado previamente). Sin embargo, sigue sin estar claro el determinismo genético y los mecanismos moleculares de la liberación de tiol mediante levadura.

50 Recientemente, Howell *et al.* identificaron tres genes *BNA3*, *CYS3* y *IRC7* que codifican β -liasa putativa en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Usando experimentos de delección de gen en un precedente de cepas de levadura de vino, se sugiere que estas enzimas pueden escindir el precursor de 4MMP en aroma volátil relacionado durante la fermentación en el zumo de uva sintético (Howell *et al.*, Applied Environ. Microbiology, 2005, 71, 5420-5426): Entre estos genes, se encontró que *BNA3* que codifica para una arilformamidasa contribuye fuertemente a la liberación de tiol volátil. Aunque se han identificado estas enzimas, los mecanismos de escisión y asimilación de precursores mediante levaduras durante la fermentación están lejos de entenderse bien.

55 Ure2p es un regulador transcripcional de genes implicado en el metabolismo de nitrógeno en levadura que actúa como regulador negativo de los genes sensibles a la represión por catabolito de nitrógeno (NCR) (Cooper, T. G. y Sumrada, R.A., J. Bacteriol., 1983, 155, 623-627; Coschinago, P.W. y Magasanik, B., Mol. Cell. Biol., 1991, 11, 822-832; Ter Schure *et al.*, FEMS Microbiol. Reviews, 2000, 24, 67-83; Magasanik, B., P.N.A.S., 2005, 102, 16537-16538; Cooper T., 1982, Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. En The molecular biology of yeast *Saccharomyces* metabolism and gene expression. Strathern, J.N., Laboratory CSH, Eds, pp. 399-461). La represión por catabolito de nitrógeno (NCR) es el mecanismo por el que una levadura puede seleccionar fuentes de nitrógeno permitiendo el mejor crecimiento (fuente de nitrógeno, fuente buena en nitrógeno o fuente rica en nitrógeno preferidas: glutamato, glutamina, amoníaco y

asparragina) sobre las fuentes de nitrógeno no preferidas (fuente pobre en nitrógeno: urea, gamma-amino-butilato, aminoácidos tales como prolina y arginina), mediante la represión de la transcripción de algunos genes (genes sensibles a NCR) implicados en la utilización (transporte: permeasas; degradación: enzimas catabólicas) de las fuentes más pobres en nitrógeno (Cooper y Sumrada, citado previamente). Bajo condiciones ricas en nitrógeno (condiciones represivas), Ure2p forma complejos con Gln3p y Gatlp, activadores transcripcionales de la familia GATA, en el citoplasma, para disminuir la transcripción de genes que codifican las proteínas necesarias para el transporte y la degradación de las fuentes pobres en nitrógeno (NCR-sensitive expression; Ter Schure *et al.*, citado previamente; Scherens *et al.*, FEMS Yeast Res., 2006, 6, 777-791). Por otro lado, si sólo están disponibles fuentes de nitrógeno no preferidas, Gln3p y Gatlp están desfosforilados y se mueven desde el citoplasma al núcleo, en el que regulan positivamente la expresión de genes sensibles a NCR para el transporte y el catabolismo de nitrógeno. El control de la represión catabólica de nitrógeno es eficaz durante la fermentación de vino (Rossignol *et al.*, Yeast, 2003, 20, 1369-1385; Beltran *et al.*, FEMS Yeast Res., 2004, 4, 625-632) y puede eliminarse mediante delección del gen *URE2*. Tal delección mejora la captación de nitrógeno lo que conduce a una mejora en la cinética de la fermentación bajo condiciones enológicas (Salmon, J.M. y Barre P., Applied and Environ. Microbiol., 1998, 64, 3831-3837; I.S. Pretorius, Yeast, 2000, 16, 675-729).

Ure2p presenta un pliegue de GST que contiene un dominio de pliegue de tiorredoxina N-terminal y un dominio alfa helicoidal C-terminal. Un cambio conformacional transmisible de Ure2p da como resultado un prión denominado [Ure3], un amiloide infeccioso, autopropagante e inactivo. El dominio de pliegue de tiorredoxina N-terminal (N-terminal ~ 90 aminoácidos) es suficiente para inducir el fenotipo [Ure3] y también se denomina el dominio de priones de Ure2p (Masison *et al.*, P.N.A.S., 1997, 94, 12503-12508). Además de su papel en la regulación de nitrógeno, Ure2p confiere protección a las células frente a toxicidad por oxidantes e iones metálicos pesados y muestra actividad de glutatión (GSH) peroxidasa (Bai *et al.*, J. Biol. Chem., 2004, 279, 50025-50030). El sitio activo de GST está localizado en una hendidura entre los dominios N- y C-terminales.

El gen *URE2* que se conserva en levadura codifica la subfamilia similar a Ure2p de proteínas compuestas por Ure2p de *Saccharomyces cerevisiae* de la secuencia de aminoácidos SEC. ID N°: 1 (354 aminoácidos, número de acceso NP_014170.1) y glutatión S-transferasas (GSTs) relacionadas de otras levaduras que tienen una secuencia que es homóloga a la SEC. ID N°: 1. Por ejemplo, el gen *URE2* de *Saccharomyces cerevisiae* está localizado desde las posiciones 219138 hasta 220202 en la cadena complementaria del cromosoma XIV (número de acceso NCR_001146; gen ID 855492, marca de locus YNL229C). La secuencia de gen *URE2* de otras levaduras está disponible en las bases de datos.

El gen *IRC7* de *Saccharomyces cerevisiae* (Gen ID: 850616 ; nombre sistemático: YFR055W) que está localizado desde las posiciones 264191 hasta 265213 en el cromosoma VI (número de acceso: NCR_001138.4) codifica Irc7p: una cistationina beta-liasa.

Los inventores han construido un mutante de delección de gen *URE2* (mutante $\Delta ure2$) en un precedente de cepas de levadura de vino y han mostrado que, bajo condiciones enológicas, el mutante $\Delta ure2$ libera 3 veces más tioles volátiles que la cepa de tipo salvaje. De manera sorprendente, el equilibrio (R)/(S) de 3MH se incrementó significativamente en la cepa $\Delta ure2$, poniendo la razón (R)/(S) a 70:30, en comparación con 50:50 en la cepa de tipo salvaje. Estos resultados indican que, además de potenciar la liberación de aroma, la delección de $\Delta ure2$ modifica la percepción sensorial del aroma de 3MH de vino mediante la intensificación de los armónicos de pomelo (descriptor 3MH(R)).

Además, en contra de lo que se sugirió en informes previos (Howell *et al.*, 2005, citado previamente), experimentos de delección de *IRC7*, *CYS3* y *BNA3* en un precedente de levadura de vino, indicaron que Irc7p es la enzima principal implicada en la escisión de precursor de tioles bajo condiciones enológicas; Bna3p y Cys3p no parecen desempeñar un papel crucial en la liberación de tioles volátiles, bajo condiciones enológicas. Además, experimentos de delección de *IRC7* en un precedente de levadura de vino $\Delta ure2$ indicaron que *IRC7* es el gen principal activado mediante delección de *URE2*. Además, en ausencia de Irc7p, no se observó el cambio estequiométrico de los enantiómeros (R)/(S)-3MH inducido mediante delección de *URE2*. Este resultado sugirió que la enzima Irc7p tenía una especificidad por sustrato mejor para (RR)-P-3MH produciendo en consecuencia más (R)-3MH.

Por tanto, desde un punto de vista biotecnológico, estas propiedades novedosas de levaduras mutantes *URE2* y levaduras que sobreexpresan *IRC7* abren nuevas vías para la producción de vino de estilo y especificaciones definidas, así como para desarrollar cepas iniciadoras de levadura de vino con capacidades de liberación de tiol volátil optimizadas.

La invención se refiere al uso de una levadura mutante *URE2* (mutante *URE2*) que tiene una mutación de pérdida de función en el gen *URE2* para incrementar la liberación de tiol volátil aromático mediante levadura durante la fermentación.

Definición

"mutación" se refiere a la sustitución, delección, adición de uno o más nucleótidos en un polinucleótido (ADNc, gen).

"mutante *URE2* que tiene una mutación de pérdida de función en el gen *URE2*", se refiere a un mutante de

levadura que tiene una pérdida parcial o total (mutación nula) de función en el gen *URE2* y muestra defectos en la represión de catabolito de nitrógeno (NCR) y/o en la actividad de glutatión peroxidasa. El defecto en la NCR da como resultado un mutante que puede asimilar fuentes más pobres en nitrógeno en presencia de fuentes buenas en nitrógeno. El defecto en la actividad de glutatión peroxidasa incrementa la sensibilidad a oxidantes e iones metálicos pesados.

por "homólogo" se entiende una secuencia con identidad suficiente con otra para conducir a una proteína que tiene la misma función, particularmente que tiene al menos una identidad del 70%, preferiblemente una identidad del 80% y más preferiblemente del 90%.

"Identidad" se refiere a la identidad de secuencia entre dos moléculas de ácido nucleico o polipéptidos. Puede determinarse la identidad comparando una posición en cada secuencia que puede alinearse para los propósitos de la comparación. Si una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. Un grado de similaridad o identidad entre secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos es una función del número de nucleótidos idénticos o coincidentes en posiciones compartidas por las secuencias de ácidos nucleicos. Pueden usarse varios programas y/o algoritmos de alineación para calcular la identidad entre dos secuencias, que incluyen FASTA o BLAST que están disponibles como parte del paquete de análisis de secuencias GCG (Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.) y pueden usarse, p. e., con los ajustes predeterminados.

"levadura de vino" se refiere a una levadura, normalmente una cepa de *Saccharomyces sp.*, con alta tolerancia a etanol, resistencia a dióxido de azufre y capacidad para fermentar rápida y eficazmente zumo de uva que contiene azúcar del 20 al 25% sin producir defectos organolépticos (acetato (acidez volátil)), sulfuro de hidrógeno y compuestos de fenol).

"tiol volátil aromático" se refiere a un compuesto químico orgánico que: (i) contiene el grupo funcional compuesto de un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno (-SH), (ii) tiene presiones de vapor suficientemente altas bajo condiciones normales para vaporizar significativamente y (iii) es oloroso (activo de sabor).

"fermentación" se refiere a cualquiera de un grupo de reacciones químicas en el que un microorganismo vivo o no vivo provoca que una sustancia orgánica se rompa en sustancias más simples; especialmente, la rotura anaeróbica de azúcar en alcohol (fermentación alcohólica).

vino se refiere a una bebida alcohólica producida mediante la fermentación del zumo de frutas, normalmente uvas. Vinos no de uva se denominan vino de fruta o vino de la tierra. Otros productos preparados a partir de materiales basados en almidón, tales como vino de cebada, vino de arroz (sake) son más similares a cervezas. Bebidas preparadas a partir de materiales fermentables tales como (aguamiel), o que se destilan, tales como brandy, no son vinos.

cerveza se refiere a una bebida fermentada alcohólica preparada más a menudo a partir de cebada malteada, lúpulo, levadura y agua.

Según la presente invención, el tiol volátil se libera a partir de precursor(es) de tiol(es) no volátil(es) presente(s) en un producto (producto inicial), durante la fermentación mediante el mutante *URE2*. La fermentación del producto inicial mediante el mutante *URE2* da como resultado un producto fermentado (producto terminado), en particular una bebida alcohólica (vino, sidra, cerveza), que tiene aroma mejorado como resultado de un contenido en tiol volátil activo en aroma más alto.

Según la presente invención, la mejora del aroma incluye la potenciación del aroma resultante de la liberación potenciada de los diferentes matices de dicho aroma. También puede incluir la potenciación selectiva de un matiz específico del aroma, dando como resultado una modificación selectiva del aroma.

El mutante *URE2* puede ser un mutante natural o un mutante obtenido mediante manipulación genética.

El mutante se deriva de cepas de levadura que pueden fermentar alta cantidad de azúcar que incluyen cepas de destilación, de panadería, de cerveza, de vino y/o cualquier otra cepa bien conocida por su capacidad para liberar compuestos aromáticos.

Los mutantes naturales que carecen de función *Ure2p* (alelos nulos o mutación nula) se conocen bien en la técnica; por ejemplo alelos mutantes *URE2*, también conocidos como *usu* y *gdhCR*, se han descrito previamente (Grenson, M., Eur. J. Biochem., 1969, 11, 249-260; Grenson *et al.*, Mol. Gen. Genet., 1974, 128, 73-85; Courchesne *et al.*, J. Bacteriol., 1988, 170, 708-713; Drillien *et al.*, J. Bacteriol., 1972, 109, 203-208 (cepa FL467-3D); Legrain *et al.*, Eur. J. Biochem., 1982, 123, 611-616 (cepa 12597a); Brandriss *et al.*, Can. J. Bot., 1995, 73 (Suppl.): S153-S159; Coffman *et al.*, J. Bacteriol., 1994, 176, 7476-7483; Xu *et al.*, Mol. Cell. Biol., 1995, 15, 2321-2330; Coschigano, P.W. y B. Magasanik, Mol. Cell. Biol., 1991, 11, 822-832). Estos mutantes se caracterizan como que poseen: (i) enzimas catabólicas de nitrógeno insensibles a la represión de catabolito de nitrógeno, mayormente en las rutas implicadas en asimilación de glutamato, glutamina, arginina, alantoína, urea, gamma-aminobutirato y prolina, (ii) actividad de permeasas de aminoácidos incrementada, (iii) resistencia de transporte ureido-succinato a la represión de nitrógeno. La mutación *URE2* se identificó para alguno de los mutantes. Por ejemplo, la mutación *Ure2-1* identificada en la cepa P5-5D de *S. cerevisiae* es una transición de t a c en la posición 1119 de la secuencia de nucleótidos provocando que la fenilalanina en la posición 313 de la secuencia de aminoácidos se sustituya por una serina (Coschigano, P.W. and Magasanik B., citado previamente).

Otros mutantes *URE2* pueden obtenerse mediante rastreo para detectar levaduras que tienen un fenotipo tal como se definió anteriormente.

Los mutantes *URE2* que tienen deleciones grandes en la secuencia codificante de *URE2* y que carecen de función *Ure2p*, se han construido según técnicas de interrupción de gen estándar en levadura (Rothstein, R.J., *Methods*

5 *Enzymol.*, 1983, 101, 202-211 ; Wach *et al.*, *Yeast*, 1994, 10, 1793-1808). Por ejemplo, los mutantes de interrupción *URE2* se construyeron mediante la sustitución de una copia cromosómica de la secuencia codificante de *URE2*, completamente o en parte (fragmentos de *HindIII* o *SacII-PvuII*), mediante un marcador de selección complementario para levadura (*LEU2*, *URA3*).

10 Los mutantes *URE2* se construyeron mediante mutagénesis aleatoria (mutagénesis UV) y se rastrearon para detectar levaduras desreprimidas para la utilización de prolina bajo represión de nitrógeno, que pueden crecer en presencia de prolina como única fuente de nitrógeno y metilamina (análogo de amoníaco) a concentración represiva (Salmon, J.M. y Barre P., *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64, 3831-3837).

15 Otros mutantes pueden construirse mediante técnicas de mutagénesis estándar (aleatorias y dirigidas a sitio) que se conocen bien en la técnica, seguido de rastreo para detectar mutantes *URE2* que tienen un fenotipo tal como se definió anteriormente.

El mutante *URE2* puede ser homocigoto o heterocigoto para la mutación *URE2*.

20 Además, la mutación *URE2* puede introducirse en un precedente apropiado mediante análisis de segregación y apareamiento espóra a espóra usando procedimientos genéticos de levadura convencional usando cepas homotáticas o heterotáticas (patente de los Estados Unidos 6.140.108; Marullo *et al.*, *FEMS Yeast Res.*, 2006, 6, 268-279; Bakalinsky *et al.*, *Applied and Environ. Microbiology*, 1990, 56, 849-857):

25 La liberación de tiol volátil se mide mediante un procedimiento adecuado bien conocido en la técnica, tal como por ejemplo: Extracción específica de tioles volátiles (Tominaga *et al.*, *J. Agric. Food. Chem.*, 1998, 46, 1044-1048; Tominaga *et al.*, *J. Agric. Food. Chem.*, 2000, 48, 1799-1802), seguido de cromatografía de gas acoplada con espectrofotómetro de masas (CG/EM; Tominaga *et al.*, *J. Agric. Food. Chem.*, 1998, 46, 1044-1048), detección fotométrica de llama (CG/FPD; Tominaga, T. y Dubourdieu, D., *Flavour Fragrance J.*, 1997, 12, 373-376), olfatometría (CG/olfatometría; Darriet *et al.*, *J. Int. Sci. Vigne Vin.*, 1991, 25, 167-174) o detección de emisión atómica (CG/AED; Howell *et al.*, *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 240, 125-129).

El aumento de tiol volátil mediante el mutante *URE2* puede evaluarse mediante comparación con una cepa de levadura casi isogénica no mutada en el gen *URE2*, crecida en las mismas condiciones.

30 Según una realización preferida de dicho uso, el mutante es un mutante nulo que carece de función *Ure2p*.

Según otra realización preferida de dicho uso, la levadura mutante *URE2* es homocigoto para la mutación *URE2*.

Según otra realización preferida de dicho uso, el mutante *URE2* es un mutante de *Saccharomyces sp.* o de un híbrido interespecífico derivado. En particular, el mutante puede derivarse de *S. cerevisiae*, *S. bayanus (var. uvarum)*, *S. paradoxus* o de híbridos interespecíficos de *Saccharomyces*, tales como *S. pastorianus*.

35 Según otra realización preferida de dicho uso, el mutante *URE2* es un mutante de levadura de vino, preferiblemente una cepa de levadura de vino comercial elegida de: VL3c, X5 y RX60.

Según otra realización preferida de dicho uso, el tiol volátil deriva de un precursor conjugado con S-cisteína, tal como se indica en la tabla I.

Tabla I: Tioles volátiles y sus precursor

Tiol volátil	Precursor
4-mercapto-4-metilpentan-2-ona (4MMP)	S-4-(4-metilpentan-2-ona)-L-cisteína
4-mercapto-4-metilpentan-2-ol (4MMPOH)	S-4-(4-metilpentan-2-ol)-L-cisteína
3-mercaptohexan-1-ol (3MH)	S-3-(hexan-1-ol)-L-cisteína
3-mercaptohexilacetato (A3MH o 3MHA)	3MH
3-mercaptopentan-1-ol (3MHOH)	S-3-(pentan-1-ol)-L-cisteína
3-mercaptoheptan-1-ol (3MHepOH)	S-3-(heptan-1-ol)-L-cisteína
3-mercapto-2-metilbutan-1-ol (3M2MBOH)	S-3-(2-metilbutan-2-ol)-L-cisteína
3-mercapto-2-metilpentan-1-ol (3M2MPOH)	S-3-(2-metilpentan-2-ol)-L-cisteína
*A3MH es el producto de esterificación de 3MH	

- 5 El tiol volátil se selecciona preferiblemente a partir del grupo constituido por: 4MMP, 3MH, 4MMPOH, 3MHA, 3MPOH, 3MHepOH, 3M2MBOH, y/o 3M2MPOH, más preferiblemente a partir de 4MMP, 3MH y/o 3MHA. Además, el 3MH que se libera mediante el mutante de levadura puede consistir ventajosamente de más enantiómero (*R*) que enantiómero (*S*); el 3MH consiste ventajosamente de al menos el 70% de enantiómero (*R*) (*relación de enantiómero (R)* respecto a (*S*) superior o igual a 70:30).
- Según otra realización preferida de dicho uso, la liberación de al menos dos tioles volátiles aromáticos diferentes se incrementa durante la fermentación.
- Según otra realización preferida de dicho uso, la liberación de tiol volátil aromático se incrementa al menos por un factor de 3.
- 10 Según otra realización preferida de dicho uso, dicha fermentación es fermentación alcohólica, preferiblemente fermentación de vino.
- 15 La invención se refiere también a un procedimiento para potenciar el aroma de un producto fermentado producido mediante fermentación de un producto inicial que contiene al menos un precursor de tiol no volátil, que comprende la incubación del producto inicial con una levadura mutante *URE2* tal como se definió anteriormente, bajo condiciones que permiten que la fermentación mediante el mutante *URE2* se produzca y, por tanto, que incremente la liberación de tiol(es) volátil(es) a partir del/de los precursor(es) de tiol no volátil, mediante la levadura mutante, durante la fermentación.
- 20 Según una realización preferida de dicho procedimiento el producto fermentado es una bebida alcohólica, preferiblemente vino, más preferiblemente vino preparado a partir de una variedad de uva no floral o simple, tal como por ejemplo: Sauvignon blanc, Gewurztraminer, Riesling, Semillon, Colombard, Scheurebe, Petit Manseng, Cabernet Sauvignon y Merlot.
- Según otra realización preferida de dicho procedimiento el precursor de tiol no volátil es un precursor conjugado con Cisteína.
- 25 El tiol volátil se selecciona preferiblemente a partir del grupo constituido por: 4MMP, 3MH, 4MMPOH, 3MHA, 3MPOH, 3MHepOH, 3M2MBOH, y/o 3M2MPOH, más preferiblemente a partir de 4MMP, 3MH y/o 3MHA.
- Según otra realización preferida de dicho procedimiento, la liberación de tiol(es) volátil(es) aromático(s) se incrementa al menos por un factor de 3.
- 30 La invención se refiere también a un procedimiento para potenciar el armónico de pomelo de un producto fermentado producido mediante fermentación de un producto inicial que contiene S-3-(hexan-1-ol)-L-cisteína (precursor de 3MH), que comprende la incubación del producto inicial con una levadura mutante *URE2* tal como se definió anteriormente, bajo condiciones que permiten que la fermentación mediante el mutante *URE2* se produzca y, por tanto, que incremente la liberación del enantiómero 3MH (*R*), mediante la levadura mutante, durante la fermentación.
- 35 Según una realización preferida de dicho procedimiento el producto fermentado es una bebida alcohólica, preferiblemente vino, más preferiblemente vino preparado a partir de una variedad de uva no floral o simple, tal como por ejemplo: Sauvignon blanc, Gewurztraminer, Riesling, Semillon, Colombard, Scheurebe, Petit Manseng, Cabernet Sauvignon y Merlot.
- Según una realización preferida de dicho procedimiento, la relación de enantiómero (*R*) respecto a (*S*) es superior o igual a 70:30 (3MH constituido por al menos el 70% de enantiómero (*R*)).
- 40 La invención se refiere también a un procedimiento para la identificación de levaduras que pueden mejorar el aroma de un producto fermentado, que comprende al menos las etapas de:
- (a) Obtención de levaduras mutantes *URE2*,
- (b) inoculación del/de los mutante(s) *URE2* de la etapa (a) en un medio de fermentación que contiene precursor(es) de tiol(es) no volátil(es), bajo condiciones que permiten que la fermentación mediante el mutante *URE2* se produzca y, por tanto, que libere el/los tiol(es) volátil(es) a partir del/de los precursor(es) de tiol(es) no volátil(es), mediante la levadura mutante, durante la fermentación,
- 45 (c) medida del/de los tiol(es) volátil(es) liberado(s) en el medio fermentado, mediante cualquier medio apropiado, tal como se definió anteriormente,
- (d) identificación del/de los mutante(s) *URE2* que puede(n) liberar alto nivel de tiol volátil aromático, en comparación con levadura que tiene un gen *URE2* de tipo salvaje en un precedente genético casi isogénico.
- 50 Los mutantes *URE2* se derivan de una cepa de levadura que puede fermentar alta cantidad de azúcar que incluye cepas de destilación, de panadería, de cerveza, de vino y/o cualquier otra cepa bien conocida por su capacidad para liberar compuestos aromáticos.
- Los mutantes *URE2* pueden obtenerse mediante rastreo de mutante(s) *URE2* a partir de una colección de levaduras o mediante manipulación genética, según procedimientos estándar, tal como se definió anteriormente.

ES 2 371 472 T3

Según una realización preferida de dicho procedimiento, el mutante *URE2* se deriva de *Saccharomyces sp.* o de un híbrido interespecífico derivado, tal como se definió anteriormente.

Según otra realización preferida de dicho procedimiento, el mutante *URE2* se deriva de una cepa de levadura de vino, preferiblemente elegida de: VL3c, X5 y RX60.

- 5 Según otra realización preferida de dicho procedimiento, la fermentación de la etapa (b) es fermentación alcohólica.

Según otra realización preferida de dicho procedimiento, la etapa (c) comprende la medida de tior(es) volátil(es) seleccionado(s) del grupo constituido por: 4MMP, 3MH, 4MMPOH, 3MHA, 3MPOH, 3MHepOH, 3M2MBOH, y/o 3M2MPOH, más preferiblemente a partir de 4MMP, 3MH y/o 3MHA.

- 10 Preferiblemente, el mutante *URE2* identificado en la etapa (d) libera al menos dos veces, preferiblemente al menos tres veces más tior volátil que una levadura que tiene un gen *URE2* de tipo salvaje en el mismo precedente genético.

Ya que *Irc7p* es la enzima principal implicada en la liberación de tioles volátiles bajo condiciones enológicas, *IRC7* que sobreexpresa levaduras tiene un potencial para mejorar el aroma de un producto fermentado.

La invención se refiere también a un procedimiento para el rastreo de levaduras que tienen un potencial para mejorar el aroma de un producto fermentado, que comprende al menos las etapas de:

- 15 (a) proporcionar una colección de levaduras,
(b) ensayo del nivel de expresión de *IRC7* en dichas levaduras durante la fermentación alcohólica,
(c) identificación de las levaduras que tienen nivel de expresión de *IRC7* alto en comparación con una levadura mutante *URE2* de un precedente genético casi isogénico.

- 20 Las levaduras son cepas de levadura que pueden fermentar alta cantidad de azúcar que incluyen cepas de destilación, de panadería, de cerveza y de vino y/o cualquier otra cepa bien conocida por su capacidad para liberar compuestos aromáticos.

Según una realización preferida de dicho procedimiento, las levaduras son de *Saccharomyces sp.* o de un híbrido interespecífico derivado, tal como se definió anteriormente.

Según otra realización preferida de dicho procedimiento, las levaduras son cepas de levadura de vino.

- 25 El nivel de expresión de *IRC7* se ensaya mediante procedimientos que se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, la transcripción de *IRC7* puede medirse mediante PCR en tiempo real cuantitativa usando protocolos estándar que se conocen en la técnica.

Según otra realización preferida de dicho procedimiento, comprende las etapas adicionales de:

- 30 (d) inoculación de las levaduras que sobreexpresan *IRC7* de la etapa (c) en un medio de fermentación que contiene precursor(es) de tior(es) no volátil(es), bajo condiciones que permiten que la fermentación mediante las levaduras que sobreexpresan *IRC7* se produzca y, por tanto, que libere el/los tior(es) volátil(es) a partir del/de los precursor(es) de tior no volátil, mediante las levaduras que sobreexpresan *IRC7*, durante la fermentación,

(e) medida del/de los tior(es) volátil(es) liberado(s) en el medio fermentado, mediante cualquier medio apropiado, tal como se definió anteriormente,

- 35 (f) identificación de las levaduras que sobreexpresan *IRC7* que pueden liberar alto nivel de tior volátil aromático en comparación con una levadura mutante *URE2* de un precedente genético casi isogénico.

Según otra realización preferida de dicho procedimiento, la etapa (e) comprende la medida de tior(es) volátil(es) seleccionado(s) del grupo constituido por: 4MMP, 3MH, 4MMPOH, 3MHA, 3MPOH, 3MHepOH, 3M2MBOH y/o 3M2MPOH, más preferiblemente a partir de 4MMP, 3MH y/o 3MHA.

- 40 Preferiblemente, las levaduras que sobreexpresan *IRC7* identificadas en la etapa (f) liberan al menos dos veces, preferiblemente al menos tres veces más tior volátil que una levadura que tiene un gen *URE2* de tipo salvaje en un precedente genético casi isogénico.

- 45 Ya que *Irc7p* es la enzima principal implicada en la liberación de tioles volátiles bajo condiciones enológicas, las levaduras que sobreexpresan *IRC7* pueden sustituir a las levaduras mutantes *URE2* en el uso y en los procedimientos, tal como se definió anteriormente.

La invención se refiere también al uso de una levadura que sobreexpresa *IRC7* para incrementar la liberación de tior volátil aromático mediante levadura durante la fermentación.

Según otra realización preferida de dicho uso, el tior volátil deriva de un precursor conjugado con S-cisteína, tal como se indica en la tabla I.

El tior volátil se selecciona preferiblemente a partir del grupo constituido por: 4MMP, 3MH, 4MMPOH, 3MHA, 3MPOH, 3MHepOH, 3M2MBOH y/o 3M2MPOH, más preferiblemente a partir de 4MMP, 3MH y/o 3MHA.

5 Además, el 3MH que se libera mediante la levadura puede consistir ventajosamente de más enantiómero (*R*) que enantiómero (*S*); el 3MH consiste ventajosamente de al menos el 70% de enantiómero (*R*) (*relación de enantiómero (R)* respecto a (*S*) superior o igual a 70:30).

Según otra realización preferida de dicho uso, la liberación de al menos dos tioles volátiles aromáticos diferentes se incrementa durante la fermentación.

Según otra realización preferida de dicho uso, la liberación de tior volátil aromático se incrementa al menos por un factor de 3.

10 Según otra realización preferida de dicho uso, dicha fermentación es fermentación alcohólica, preferiblemente fermentación de vino.

15 La invención se refiere también a un procedimiento para potenciar el aroma de un producto fermentado producido mediante fermentación de un producto inicial que contiene al menos un precursor de tior no volátil, que comprende la inoculación del producto inicial con una levadura que sobreexpresa *IRC7*, bajo condiciones que permiten que la fermentación mediante la levadura que sobreexpresa *IRC7* se produzca y, por tanto, que incremente la liberación de tior(es) volátil(es) a partir del/de los precursor(es) de tior no volátil, mediante la levadura que sobreexpresa *IRC7*, durante la fermentación.

20 Según una realización preferida de dicho procedimiento, el producto fermentado es una bebida alcohólica, preferiblemente vino, más preferiblemente vino preparado a partir de una variedad de uva no floral o simple, tal como por ejemplo: Sauvignon blanc, Gewurztraminer, Riesling, Semillon, Colombard, Scheurebe, Petit Manseng, Cabernet Sauvignon y Merlot.

Según otra realización preferida de dicho procedimiento el precursor de tior no volátil es un precursor conjugado con Cisteína.

25 El tior volátil se selecciona preferiblemente a partir del grupo constituido por: 4MMP, 3MH, 4MMPOH, 3MHA, 3MPOH, 3MHepOH, 3M2MBOH y/o 3M2MPOH, más preferiblemente a partir de 4MMP, 3MH y/o 3MHA.

Según otra realización preferida de dicho procedimiento, la liberación de tior(es) volátil(es) aromático(s) se incrementa al menos por un factor de 3.

30 La invención se refiere también a un procedimiento para potenciar el armónico de pomelo de un producto fermentado producido mediante fermentación de un producto inicial que contiene S-3-(hexan-1-ol)-L-cisteína (precursor de 3MH), que comprende la inoculación del producto inicial con una levadura que sobreexpresa *IRC7* tal como se definió anteriormente, bajo condiciones que permiten que la fermentación mediante la levadura que sobreexpresa *IRC7* se produzca y, por tanto, que incremente la liberación del enantiómero 3MH (*R*), mediante la levadura que sobreexpresa *IRC7*, durante la fermentación.

35 Según una realización preferida de dicho procedimiento el producto fermentado es una bebida alcohólica, preferiblemente vino, más preferiblemente vino preparado a partir de una variedad de uva no floral o simple, tal como por ejemplo: Sauvignon blanc, Gewurztraminer, Riesling, Semillon, Colombard, Scheurebe, Petit Manseng, Cabernet Sauvignon y Merlot.

Según una realización preferida de dicho procedimiento, la relación de enantiómero (*R*) respecto a (*S*) es superior o igual a 70:30 (3MH constituido por al menos el 70% de enantiómero (*R*)).

40 La levadura que sobreexpresa *IRC7* puede obtenerse mediante rastreo de una colección de levaduras tal como se definió anteriormente o mediante manipulación genética, según procedimientos estándar.

45 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de microbiología, ADN recombinante, biología molecular, biología celular y cultivo celular que están dentro del alcance de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, *Methods of classical genetics*. Biotechnology Handbooks *Saccharomyces*. Vol 4. (Wickner, R, Truite M. & Oliver S., Eds, 1991, pp 101-147); *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, (Sambrook et al, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

50 Además de las características precedentes, la invención también comprende otras características que surgen de la descripción que sigue, que se refiere a ejemplos que ilustran el uso de mutantes *URE2* según la invención, así como a los dibujos adjuntos en los que:

- la figura 1 ilustra la estéreoselectividad de mutantes $\Delta ure2$ para enantiómeros 3MH. En la cepa de delección $\Delta ure2$, la producción de 3MH se incrementó fuertemente en comparación con el control; además, la relación 3MH(*R*)/(*S*) se desequilibró ampliamente, con el 70% de 3MH(*R*). Los valores son el promedio de los experimentos por triplicado.

- la figura 2 representa la secuencia de un fragmento de 346 pb del gen *URE2* de tipo salvaje (cepa S288c; SEC. ID N°: 16) en comparación con la de un alelo defectivo *URE2* que lleva la mutación G182E (SEC. ID N°: 17). El fragmento de 346 pb corresponde a las posiciones de 219511 a 219856 de la secuencia NCBI con número de acceso NC_001146. La mutación introduce un sitio *Mnl1* (cctc; destacado en gris) en el alelo *URE2* mutante que puede detectarse mediante PCR/RFLP (la escisión de *Mnl1* se produce en la posición 156 del fragmento).

Ejemplo 1: La delección de *URE2* mejora la liberación de tiol bajo condiciones enológicas

1) Material y procedimientos

a) Condiciones de cultivo y fermentación

Se cultivaron las levaduras a 30°C en medio YPD completo (extracto de levadura al 1%, peptona al 1% y dextrosa al 2%) solidificado con agar al 2% en caso necesario. Se añadió G418 (100 µg/ml) a YPD para seleccionar cepas transformadas. Se indujo la esporulación sobre medio de acetato (acetato de potasio al 1%, agar al 2%) durante tres días a 24°C. Se llevaron a cabo experimentos de fermentación a 24°C en botellas de 350 ml que contenían medio modelo sintético descrito previamente como medio KP (Marullo *et al.*, FEMS Yeast Research, 2006, 6, 268-279). Se tamponó este medio hasta pH 3,3 y se contuvieron 80 g l⁻¹ de glucosa, 80 g l⁻¹ de fructosa y 190 mg l⁻¹ de nitrógeno disponible. Se añadieron precursores de aroma (P-4MMP y P-3MH) al medio antes de la inoculación de levadura a diferentes concentraciones, tal como se indico en el texto. Se inocularon cepas de levadura a 1x10⁶ células ml⁻¹ a partir de un cultivo durante toda una noche. Se midió la liberación de tiol volátil después de la fermentación completa (medida mediante pérdida de peso). Se llevaron a cabo todos los experimentos por triplicado y se repitieron independientemente dos o tres veces.

b) Cepas de levadura

Se derivó la cepa VL3-1D de *Saccharomyces cerevisiae* de un iniciador comercial (VL3c, Laffort Oenologie). Se asume que VL3-1D, un clon de spora diploide homotética (*HO/HO*) obtenido mediante microdissección de tétradas, es totalmente homocigoto (Marullo *et al.*, FEMS Yeast Research, 2004, 4, 711-719). Las cepas Δ-U (*Δure2/Δure2*), Δ-B (*Δbna3/Δbna3*), *Δcys3/Δcys3* y *Δirc7/Δirc7* se construyeron a partir de la cepa VL3-1D usando la estrategia de delección mediante PCR (Baudin *et al.*, Nucleic Acids Research, 1993, 21, 3329-3330; Wach *et al.*, Yeast, 1994, 10, 1793- 1808).

Se obtuvieron casetes de delección mediante amplificación del ADN genómico de cepas eliminadas apropiadas (BY4742 background) a partir de la colección Euroscarf (Frankfurt, Alemania). Se obtuvieron los casetes *ure2::KanMx4* y *bna3::KanMx4* usando los pares de cebadores p59: 5'-caaatgccgagaaaaataccgc-3' (SEC. ID N°: 2) y p60: 5'-aaacgaacgccgaaacacata-3' (SEC. ID N°: 3), pl: 5'-gagcagattgtttgtagtagg-3' (SEC. ID N°: 4), p2: 5'-ttcctaagcaactcatcgtg-3' (SEC. ID N°: 5), respectivamente. Se obtuvieron los casetes *irc7::KanMx4* y *cys3::KanMx4* usando los pares de cebadores p314: 5'-tgataacgatattttgtgcctc-3' (SEC. ID N°: 6) y p315: 5'-tgatacagctagaaaattgaacca-3' (SEC. ID N°: 7) y p316: 5'-gacccataccactctttttgtt-3' (SEC. ID N°: 7) y p317: 5'-tgatctcgttctagtctggaagc-3' (SEC. ID N°: 8), respectivamente.

Se transformaron químicamente las células (Puig *et al.*, J. Agric. Food Chem., 1998, 46, 1689-1693) y se seleccionaron positivamente en YPD-G418. Se esporularon los clones crecientes de G418 y se microdisseccionaron para obtener clones de spora completamente homocigotos que llevan dos copias de gen eliminado. Se verificaron las delecciones correctas mediante PCR.

c) Síntesis de precursores

Síntesis de P-4MMP

Se sintetizó S-4-(4-metilpentan-2-ona)-L-cisteína (P-4MMP) mediante la adición de óxido de mesitilo (22 mmol) en Lcisteína (20 mmol) en agua destilada durante 16 h. Después de la extracción con éter dietílico (2 x 30 ml), se enfrió la capa acuosa hasta 0°C y se añadió dicarbonato de di-*ter*-butilo (4,6 g, 21 mmol) en 20 ml de THF gota a gota y se agitó durante toda una noche. Después de la eliminación de THF mediante evaporación rotatoria, se ajustó la capa acuosa hasta pH 2-3 con ácido cítrico al 10 % en agua y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con agua (50 ml) y salmuera (50 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. La purificación del producto en bruto mediante cromatografía en gel de sílice (pentano/ éter dietílico - 35/65, R_f = 0,5) proporcionó un aceite incoloro (4,5 g, 70 %). Se añadió 1 ml de HCl acuoso 10 M (10 mmol) a (*ter*butoxicarbonil)- S-4-(4-metilpentan-2-ona)-L-cisteína (0,63g, 2 mmol) a temperatura ambiente. Después de que se completara la reacción, se retiró el exceso de HCl mediante calentamiento a 60°C bajo presión reducida (0,1 mm Hg).

Síntesis de P-3MH

Se sintetizó S-3-(hexan-1-ol)-L-cisteína (P-3MH) según (Wakabayashi *et al.*, J. Agric. Food Chem., 2004, 52, 110-116) y se modificó como sigue: Se añadió *trans*-2-hexen-1-al (5 mmol) a una solución agitada de N-(*ter*-butoxicarbonil) Lcisteína (4,5 mmol) y carbonato de cesio (2,25 mmol) en acetonitrilo durante toda una noche. Después de la eliminación del acetonitrilo mediante evaporación rotatoria, se añadió borohidruro de sodio (2,5 mmol) en 10 ml de metanol gota a gota y se agitó durante toda una noche. Se llevó a cabo la desprotección de 0,5 ml de N-(*ter*-butoxicarbonil)-S-3-(hexan- 1-ol)-L-cisteína mediante la adición de HCl 10 M (5 mmol). Se concentró el producto en bruto y se purificó en una columna de intercambio de iones (DOWEX 50 WX8).

d) Ensayos de tiol volátil

Se extrajeron tioles volátiles al final de la fermentación a partir de 250 ml de medio sintético usando el procedimiento descrito previamente (Tominaga *et al.*, J. Agric. Food Chem., 1998b, 46, 1044-1048) y se modificaron según (Tominaga *et al.*, J. Agric. Food Chem., 2000b, 48, 1799-1802). Se cuantificaron cantidades de 4MMP, 3MH y 3MHA mediante CGEM (cromatografía de fases y microextracción en fase sólida) según los procedimientos descritos por Tominaga *et al.*, 1998b.

2) Resultados:

La cepa VL3-1D es un clon de spora meiótica (*HO/HO*) de la cepa comercial VL3c descrita previamente por su fuerte capacidad para revelar tioles volátiles (Murat *et al.*, Am. J. Enol. Vitic., 2001, 52, 136-140; Howell *et al.*, FEMS Microbiol Lett., 2004, 240, 125-129; Howell *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 2005, 71, 5420-5426; Masneuf-Pomarede *et al.*, Int. J. Food Microbiol., 2006, 108385-390). Se obtuvo la cepa Δ -U que lleva dos copias eliminadas de *URE2* ($\Delta ure2/\Delta ure2$) a partir de VL3-1D mediante delección mediada por casete *ure2::KanMx4*.

Se compararon las propiedades cinéticas de este mutante con la cepa *ts* usando biorreactores tal como se describió previamente (Marullo *et al.*, FEMS Yeast Research, 2006, 6, 268-279). Bajo condiciones enológicas, ambas cepas mostraron parámetros cinéticos idénticos. Entonces se ensayó la liberación de tiol volátil de cepas *ts* y $\Delta ure2$ en cultivos por lotes de 350 ml usando un medio de uva sintético con la adición de precursores sintéticos. Se ajustaron las concentración de precursor hasta 20 nM para P- 4MMP y 2000 nM para P-3MH de acuerdo con la composición de mosto de Sauvignon Blanc estándar (Peyrot des Gachons *et al.*, J. Agric. Food Chem., 2000, 48, 3387-3391). Durante la fermentación, el metabolismo de levadura produjo 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona (4MMP) a partir de su conjugado de S-cisteína (S-4-(4-metilpentan-2-ona)-L-cisteína) de aquí en adelante denominado como P-4MMP. De manera similar, se produjo 3-mercaptohexanol (3MH) a partir de S-3((hexan-1-ol)-L-cisteína (de aquí en adelante denominado como P 3MH). También puede acetilarse una parte de 3MH durante la fermentación, produciendo 3-acetato de mercaptohexilo (3MHA). Al final de la fermentación, se extrajeron de manera orgánica 4MMP, 3MH, y 3MHA producidos mediante levadura y se midieron mediante CG-EM (Tominaga *et al.*, Flavour Fragr. J., 1998a, 13, 159-162). Se demostró previamente la ausencia de tioles volátiles en el control no fermentado (Murat *et al.*, Am. J. Enol. Vitic., 2001, 52, 136 140). Tal como se muestra en la tabla II, el mutante $\Delta ure2$ liberó 3 veces más tioles volátiles (4MMP, 3MH y 3MHA) que la cepa de tipo salvaje.

Tabla II: La delección de *URE2* potencia la liberación de tiol volátil bajo condiciones enológicas

Cepas	Aromas liberados (ng l ⁻¹) ^a		
	4MMP	3MH	3MHA
VL3-1D (<i>ts</i>)	30,2 +/- 1,9	467,5 +/- 55,4	85,9 +/- 21,9
Δ -U ($\Delta ure2$)	87,6* +/- 8,5	1473,2* +/- 147,2	276,2* +/- 14,5

^a se midieron los aromas al final de la fermentación alcohólica de medio sintético que contenía precursores de aroma: P-4MMP=20 nM, P-3MH 2000 nM.

Los valores son el promedio de dos experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

* Diferente significativamente del control, ANOVA valor p <0,001

Ejemplo 2: La delección de *URE2* modifica el equilibrio de enantiómeros de 3MH

1) Material y procedimientos*Separación de dos enantiómeros de 3MH*

Se inyectaron tioles volátiles extraídos en una columna quiral (INTERCHIM) Lipodex C (50 m x 0,25 mm) para separar los dos enantiómeros de 3MH. Las condiciones de cromatografía fueron idénticas a las descritas por Tominaga *et al.* (J. Agric. Food Chem., 2006, 54, 7251-7255).

2) Resultados:

3MH es una molécula quiral con 2 enantiómeros, 3MH(R) y 3MH(S). Usando una metodología de CG-EM específica (Tominaga *et al.*, J. Agric. Food. Chem., 2006, 54, 7251-7255), se midieron R y S-3MH en medio sintético al final de la fermentación alcohólica. En la figura 1 se muestra la cantidad relativa de los enantiómeros de 3MH de cepas VL3-1D (*ts*) y Δ -U ($\Delta ure2$). Tal como se observó generalmente en el vino blanco seco, el medio fermentado mediante VL3-1D (*ts*) presentaba una mezcla racémica entre los enantiómeros (R) y (S) de 3MH (50:50). De manera sorprendente, las formas (R) y (S) en la cepa $\Delta ure2$ se incrementaron de manera significativa (4,1 veces y 2,0 veces, respectivamente),

poniendo la relación (R)/(S) a 70:30. Esta modificación del equilibrio (R)/(S) de 3MH sugiere que se producen mecanismos estéreselectivos en mutantes de *Δure2*. Estos hallazgos indicaron que, además de potenciar la liberación de aroma, la delección de *Δur e 2* puede modificar la percepción sensorial del aroma de 3MH de vino mediante la intensificación de los armónicos de pomelo (descriptor 3MH(R)).

- 5 Estos hallazgos demostraron que el gen *URE2* inhibe fuertemente los mecanismos de liberación de tiol volátil durante la fermentación alcohólica, implicado probablemente la represión catabólica de nitrógeno. Debido a la regulación en dirección 5', diversas dianas reguladas pueden afectar a la liberación de tiol. La activación completa de los factores de transcripción Gln3p y Gatlp pueden potenciar la expresión de las dos principales categorías de genes. En primer lugar, los genes regulados para aumentar su expresión que codifican enzimas catabólicas de nitrógeno (Scherens *et al.*, FEMS, Yeast Research, 2006, 6, 777-791) pueden contribuir a la potenciación de la reserva de enzimas de escisión de precursores. En segundo lugar, transportadores pobres en nitrógeno expresados pueden incrementar la captación de precursor debido a su estructura similar a aminoácido.

Ejemplo 3: **Impacto de diversas β-liasas de levadura sobre la liberación de tioles volátiles en función de la concentración de precursor**

15 1) Material y procedimientos

Véase el ejemplo 1

2) Resultados

- Se describió que tres genes (*BNA3*, *CYS3* y *IRC7*) contribuían fuertemente a la liberación de tioles volátiles (Howell *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 2005, 71, 5420-5426). Ya que la delección de *URE2* parece que incrementa principalmente la actividad de escisión enzimática, se investigó en profundidad el papel de estos tres genes y su regulación mediante NCR en condiciones enológicas. Se eliminaron las dos copias de los genes *BNA3*, *CYS3* y *IRC7* en el precedente de VL3-1D. En primer lugar se ensayó el efecto de la delección de estos genes mediante la medida de la liberación de tioles volátiles al final del proceso de fermentación alcohólica de un zumo de uva sintético que contenía cantidades naturales de precursores de aroma (es decir, P-4MMP = 20 nM y P-3MH = 3000 nM). A estas concentraciones, la delección de *IRC7* redujo drásticamente la liberación de 3MH (-41%) y de 4MMP (-96%) (tabla III) mientras que la delección de *BNA3* y de *CYS3* no afectó a la liberación de tioles. Este resultado contradice parcialmente el presentado por (Howell *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 2005, 71, 5420-5426) que mostraba un papel para los genes *CYS3*, *BNA3* y *IRC7* en la liberación de 4MMP. Sin embargo, sus conclusiones se basaron en condiciones experimentales en las que el medio sintético contenía 0,1 g l⁻¹ (450 μM) de P-4MMP, mientras que en el zumo de uva natural sólo se encuentran unos pocos μg l⁻¹ (de 0,5 a 20 nM) Peyrot des Gachons *et al.*, J. Agric. Food Chem., 2000, 48, 3387-3391). Se planteó la hipótesis de que estas concentraciones altas pueden influenciar las condiciones estequiométricas de la reacción de β liasa. Para verificar esta hipótesis, se midió la liberación de 4MMP en medio modelo sintético que contenía 200.000 nM de P- 4MSP, correspondientes a 10.000 veces la concentración de P-4MMP en el zumo de uva. De acuerdo con los hallazgos de Howell, a esta concentración, la liberación de 4MMP caía cerca del 81% y del 96% para las cepas *Δ bna3* y *Δ irc7*, respectivamente (tabla III). Sin embargo, la delección del gen *CYS3* no afectó a esta liberación incluso cuando se usó una concentración alta de P-4MSP.

Tabla III: La cistationina β-liasa *Irc7p* es la principal enzima implicada en la escisión de precursores de tiol

Cepas	concentraciones de precursor					
	P-4MMP 20 nM (1X)		P-4MMP 200 μM (10.000X)		P-3MH 2.000 nM (1X)	
	4MMP liberado		4MMP liberado		3MH liberado	
	Media	CV (%)	Media	CV (%)	Media	CV (%)
TS	100,0	5,6	100,0	5,0	100,0	2,7
<i>Δ cys3</i>	92,5	6,0	97,1	1,9	104,5	6,5
<i>Δ irc7</i>	3,6**	21,1	1,7**	0,0	58,5 **	9,7
<i>Δ bna3</i>	115,5	5,7	32,3 **	15,1	91,7	7,3

**diferente estadísticamente de la cepa TS, ANOVA P= 0,01.

Ejemplo 4: El efecto de potenciación de la delección de *URE2* está mediada por la expresión de *Irc7p*.

1) Material y procedimientos

Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Se recogieron muestras de biomasa para ensayo de expresión para el 10, 20, 40 y el 60 % del total de CO₂ liberado. Se centrifugaron muestras de diez mililitros (5 min, 10.000 g) para sedimentar las células y se logra además la extracción completa según las instrucciones del fabricante. Se realizó el tratamiento de lisis usando un aparato Fastprep FP120 con los parámetros siguientes: 45 s a 65 m s⁻¹ aplicado dos veces. Se separaron los dos ciclos mediante 5 min sobre hielo. Se trató la contaminación de ADN usando kit libre de ADN (AMBION INC), según las instrucciones del fabricante.

Se comprobó la ausencia de ADN contaminante mediante PCR directamente sobre los ARN. Se retrotranscribieron los ARN en ADNc usando el kit de síntesis de ADNc Script™ (BIO-RAD), según las instrucciones del fabricante. Para ambas cepas (*Δure2* y *TS*) se realizaron extracciones a partir de tres lotes independientes. Análisis de expresión de *IRC7* mediante PCR en tiempo real.

Se realizó PCR en tiempo real cuantitativa con SYBR-Green I usando el sistema de detección de PCR en tiempo real iCycler iQ (BIO-RAD). Cebadores p325 (5'-tcagcttctgggctgttct-3', (SEC. ID N°: 10) y p326 (5'-tcaacaccgaactggccaat-3', SEC. ID N°: 11) y p323 (5'-taccggccaaatcgattctc-3', SEC. ID N°: 12) y p324 (5'-cactggattgtttggatacc-3', SEC. ID N°: 13) se usaron para amplificar 137 pb de *IRC7* (gen de interés) y 124 pb de *ACT1* (gen de mantenimiento), respectivamente.

Se ha descrito el uso de *ACT1* como gen de mantenimiento de manera rutinaria en la bibliografía (Giulietti *et al.*, Methods, 2001; 25, 386-401 ; Bleve *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69, 4116-4122) como marcador de cuantificación para muchas especies de levaduras a través de PCR en tiempo real cuantitativa. Se llevaron a cabo PCRq en tiempo real usando mezcla iQ SYBR Green Super (BIO-RAD). Se añadieron los cebadores a una concentración de 0,3 mM cada uno. El programa de PCR fue como sigue: 3 min a 95°C para desnaturalización inicial, entonces 40 ciclos de 30 s a 95°C durante, 30 s a 58°C y 30 s a 72°C. Se llevó a cabo una curva de fusión final mediante 51 ciclos de 10 s comenzando a 65°C con etapas de incremento de 0,5°C en cada ciclo. La eficacia fue del 97,9 % y del 102,8 % para *IRC7* y *ACT1*, respectivamente. Se determinó una curva estándar para cada gen en la que *x* es el ciclo umbral e *y* es el valor logarítmico de la cantidad de partida (ng): (*IRC7* $y = -3,374 x + 19,132$, $R^2 = 0,997$ y *ACT1* $y = -3,257 x + 20,308$, $R^2 = 0,993$). Se obtuvieron curvas estándar a partir de 8 puntos y se observó la linealidad desde 0,15 pg hasta 63 ng de ADN. Se fijó manualmente un valor umbral para la fluorescencia de todas las muestras, para mantener el mismo valor en cada experimento. Para la comparación de cepas, se calcularon las cantidades relativas de *IRC7* y de *ACT1* mediante representación sobre la curva estándar.

Se dan los resultados como la expresión en veces relativa de (*IRC7/ACT1*) tomando como referencia (=1) el valor de tipo salvaje al 10% de CO₂ producido.

2) Resultados

Se demostró recientemente la activación de la transcripción de *IRC7*(*YFR055c*) en un precedente de *Δure2* en condiciones de laboratorio (Scherens *et al.*, Yeast Research, 2006, 6, 777-791). Se investigó esta activación de la transcripción durante la fermentación alcohólica para la cepa de vino de este estudio, usando PCR en tiempo real.

Tabla IV: La expresión de *IRC7* se potencia durante la fermentación alcohólica en una cepa *Δure2*.

Cepas	Expresión en veces relativa (<i>IRC7/ACT1</i>) a diferente % de CO ₂ producido				
	10,0	20,0	40,0	60,0	80,0
<i>TS</i>	1,00 +/- 0,94	1,41 +/- 0,80	1,64 +/- 0,44	1,18 +/- 0,34	0,93 +/- 0,31
<i>Δure2</i>	0,67 +/- 0,58	1,18 +/- 0,06	3,36* +/- 0,52	2,36 +/- 0,60	6,40 +/- 2,48

*diferente estadísticamente de la cepa *TS*, ANOVA P= 0,05.

Durante la fermentación alcohólica, el nivel de transcripción de *IRC7* se incrementó fuertemente en la cepa *Δure2* en comparación con el control (*TS*) (tabla IV). Se encontró que los niveles de transcripción de *IRC7* eran diferentes significativamente después de la liberación del 40% del CO₂ (ANOVA de una dirección, P=0,05). Aunque pequeño, este incremento de 2 veces en la expresión de *IRC7* en la cepa *Δure2* explicaría la sobreproducción de 3 veces observada de tioles. No obstante, otras enzimas no investigadas, junto con *Irc7p*, pueden activarse mediante delección de *URE2* y entonces contribuir adicionalmente a la escisión enzimática. Por lo tanto, se investigó la contribución de *Irc7p* en un precedente de *Δure2* mediante la comparación de la liberación de tioles en *TS*, *Δure2*, *Δirc7* y el mutante doble *Δure2 Δirc7* (tabla V).

Tabla V: IRC7 es el gen principal activado mediante delección de URE2

Cepas	4MMP liberado		3MH liberado		3MHA liberado			
	Media	CV (%)	Media	CV (%)	forma (R) (%)	forma (S) (%)	Media	CV (%)
TS	100	5,6	100	2,7	55	45	100	
$\Delta ure2$	406,2 **	18,6	335,1 **	19,6	77 *	23*	231,0 **	13,3
$\Delta irc7$	5,1**	0,5	62,4 **	2,8	48	52	53,3 **	1,3
$\Delta irc7\Delta ure2$	5,0 **	0,2	64,2 **	5,4	49	51	55,2 **	5,9

*diferente estadísticamente de la cepa TS, ANOVA P= 0,05.

**diferente estadísticamente de la cepa TS, ANOVA P= 0,01.

La liberación de 4MMP y de 3MH fue idéntica en las cepas $\Delta irc7$ y $\Delta ure2 \Delta irc7$. Por lo tanto en ausencia de la enzima Irc7p, la delección de URE2 no incrementa la liberación de tioles. Esto demostró la relación epistática entre IRC7 y URE2 sugiriendo que en células reprimidas, ninguna otra enzima que contribuye a la liberación de aroma se activó a través de la ruta de NCR. Por tanto, Irc7p fue la única enzima cuya actividad de escisión de precursor se indujo transcripcionalmente a través de la ruta de regulación de NCR. Además, si Irc7p estaba ausente, no se observó el cambio estequiométrico de los enantiómeros (R)/(S)-3MH inducido mediante delección de URE2 (tabla VI). Este hallazgo sugirió que la enzima Irc7p tenía una afinidad por sustrato mejor para (RR)-P-3MH produciendo en consecuencia más (R)-3MH. Se ha descrito previamente este tipo de estereoselectividad para los diastereoisómeros de P-3MH para otras β -liasas (Wakabayashi *et al.*, J Agric. Food Chem., 2004, 52, 110-116).

Ejemplo 5: Selección de cepa de levadura mutante URGE2

Se introdujo un alelo defectivo de URE2 en un precedente de cepa industrial (cepa derivada X5) mediante procedimiento de retrocruzamiento. Se produjo el alelo de URE2 mediante un mutante EMS obtenido a partir de una cepa de levadura de laboratorio (Sigma 1219) según el procedimiento descrito en Drillien, R y F. Lacroute (J. Bacteriol., 1972, 109, 203-208). Comparado con el genoma S288c este mutante mostró una sustitución G182E en la parte central de la proteína (figura 2) correspondiente con la coordenada genómica de 219511 a 219856. Esta sustitución puede seguirse mediante una prueba de PCR/RFLP amplificando esta porción genómica mediante los cebadores P273 (5'-aaagctgtccaatcattggc-3', SEC. ID N°: 14) y P274 (5'-tttctctcacaggctcgcg-3', SEC. ID N°: 15). Se detectó el alelo mutante mediante el corte del fragmento de PCR con la enzima Mnl1 que corta de manera específica dicho fragmento en la posición 156.

Se siguió el alelo mutante URE2 durante un experimento de retrocruzamiento tal como se describió para otros rasgos por (Marullo *et al.*, 2007 FEMS Yeast Res., 2007, 7, 1295-1306, Epub 2007 Sep 20). Después de dos retrocruzamientos, se comparó una cepa (BC2-3) que lleva este alelo con la cepa parental inicial (PI). Se esperaba que esta cepa compartiera más del 75% de homología con la cepa parental inicial. En términos de producción de tioles volátiles, esta cepa produce 3 veces más 3MH que la cepa parental inicial (tabla VI).

Tabla VI: Potenciación de la producción de 3MH para una cepa URE2 obtenida mediante retrocruzamiento

Cepa	PI			BC2-3		
	1	2	3	1	2	3
3MH ng/l	1040	1069	798	4441	4489	3536

* datos a partir del ensayo por triplicado

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SARCO

UNIVERSITE VICTOR SEGALEN BORDEAUX 2

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

MARULLO, Philippe

THIBON, Cecile

DUBOURDIEU, Denis

TOMINAGA, Takatoshi

<120> Uso de levaduras mutantes *URE2* para incrementar la liberación de tioles volátiles aromáticos mediante levadura

5 durante la fermentación

<130> s2012PCT1

<160> 17

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

10 <211> 354

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

```

Met Met Asn Asn Asn Gly Asn Gln Val Ser Asn Leu Ser Asn Ala Leu
 1          5          10          15

Arg Gln Val Asn Ile Gly Asn Arg Asn Ser Asn Thr Thr Thr Asp Gln
 20          25          30

Ser Asn Ile Asn Phe Glu Phe Ser Thr Gly Val Asn Asn Asn Asn Asn
 35          40          45

Asn Asn Ser Ser Ser Asn Asn Asn Asn Val Gln Asn Asn Asn Ser Gly
 50          55          60

Arg Asn Gly Ser Gln Asn Asn Asp Asn Glu Asn Asn Ile Lys Asn Thr
 65          70          75          80

Leu Glu Gln His Arg Gln Gln Gln Gln Ala Phe Ser Asp Met Ser His
 85          90          95

Val Glu Tyr Ser Arg Ile Thr Lys Phe Phe Gln Glu Gln Pro Leu Glu
 100         105         110

Gly Tyr Thr Leu Phe Ser His Arg Ser Ala Pro Asn Gly Phe Lys Val
 115         120         125

Ala Ile Val Leu Ser Glu Leu Gly Phe His Tyr Asn Thr Ile Phe Leu
 130         135         140

Asp Phe Asn Leu Gly Glu His Arg Ala Pro Glu Phe Val Ser Val Asn
 145         150         155         160

Pro Asn Ala Arg Val Pro Ala Leu Ile Asp His Gly Met Asp Asn Leu
 165         170         175
    
```

ES 2 371 472 T3

Ser Ile Trp **Glu** Ser Gly Ala Ile Leu Leu His Leu Val Asn Lys Tyr
 180 185 190

Tyr Lys **Glu** Thr Gly Asn Pro Leu Leu Trp Ser Asp Asp Leu Ala Asp
 195 200 205

Gln Ser Gln Ile Asn Ala Trp Leu Phe Phe Gln Thr Ser Gly His Ala
 210 215 220

Pro Met Ile Gly Gln Ala Leu His Phe Arg Tyr Phe His Ser Gln Lys
 225 230 235 240

Ile Ala Ser Ala Val **Glu** Arg Tyr Thr Asp Glu Val Arg Arg Val Tyr
 245 250 255

Gly Val Val **Glu** Met Ala Leu Ala **Glu** Arg Arg Glu Ala Leu Val Met
 260 265 270

Glu Leu Asp Thr **Glu** Asn Ala Ala Ala Tyr Ser Ala **Gly** Thr Thr Pro
 275 280 285

Met Ser Gln Ser Arg Phe Phe Asp Tyr Pro Val Trp Leu Val Gly Asp
 290 295 300

Lys Leu Thr Ile Ala Asp Leu Ala Phe Val Pro Trp Asn Asn Val Val
 305 310 315 320

Asp Arg Ile Gly Ile Asn Ile Lys Ile **Glu** Phe Pro Glu Val Tyr Lys
 325 330 335

Trp Thr Lys His Met Met Arg Arg Pro Ala Val Ile Lys Ala Leu Arg
 340 345 350

Gly Glu

<210>2

<211> 22

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 2 caaatgccga gaaaaatacc gc 22

<210>3

10 <211> 21

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador
 <400> 3 aaacgaacgc cgaacacat a 21
 <210>4
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 4 gagcagattg tttgagtag g 21
 10 <210>5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <400> 5 ttctaagca actcatcgtg 20
 <210>6
 <211> 24
 <212> ADN
 20 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador p314
 <400> 6 tgataacgat ttattgtcg cctc 24
 <210>7
 25 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador p315
 30 <400> 7 tgatacagct agaaaattga acca 24
 <210>8
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 35 <220>
 <223> cebador p316
 <400> 8 gacccatcac cacttcttt tgtt 24
 <210>9

<211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 5 <223> cebador p317
 <400> 9 tgatctcgtt ctagtctcgg aagc 24
 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador p325
 <400> 10 tcagcttctg ggcttggttc t 21
 <210> 11
 15 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador p326
 20 <400> 11 tcaacaccga acttgccaa t 21
 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cebador p323
 <400> 12 taccggccaa atcgattctc 20
 <210> 13
 <211> 22
 30 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador p324
 <400> 13 cactgtgatt gtttggata cc 22
 35 <210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

ES 2 371 472 T3

<220>

<223> cebador p273

<400> 14 aaagcttgtc caatcattgg c 21

<210> 15

5 <211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador p274

10 <400> 15 ttttctctca caggtctgcg 20

<210> 16

<211>346

<212> ADN

<213> secuencia artificial

15 <220>

<223> fragmento *URE2* de tipo salvaje de 346 pb

<400> 16

```

aaagcttgtc caatcattgg cgcattgccct gacgtttggga agaacaacca tgcgttgatt    60
tgtgattggt cagctaaatc atcggaccag agtaatggat taccagtctc tttgtaatat    120
ttatttacca aatgtaataa aatcgccctt gattcccaaa tagacaagtt gtccatacca    180
tgatcgatta aagctggaac tcttgatta gggttcacag acacaaattc gggggcccta    240
tgttcgcaa gattgaaatc taggaagatt gtgttataat gaaatccaag ttcacttagt    300
actatagcaa ctttgaatcc attaggcgca gacctgtgag agaaaa                    346
    
```

20 <210> 17

<211> 346

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> fragmento mutante *URE2* G183E de 346 pb

<400> 17

```

aaagcttgtc caatcattgg cgcattgccct gacgtttggga agaacaacca tgcgttgatt    60
tgtgattggt cagctaaatc atcggaccag agtaatggat taccagtctc tttgtaatat    120
ttatttacca aatgtaataa aatcgccctt gattcccaaa tagacaagtt gtccatacca    180
tgatcgatta aagctggaac tcttgatta gggttcacag acacaaattc gggggcccta    240
tgttcgcaa gattgaaatc taggaagatt gtgttataat gaaatccaag ttcacttagt    300
actatagcaa ctttgaatcc attaggcgca gacctgtgag agaaaa                    346
    
```

REIVINDICACIONES

1. Uso de una levadura mutante *URE2* que tiene una mutación de pérdida de función en el gen *URE2* para incrementar la liberación de tior volátil aromático mediante levadura durante la fermentación.
2. Uso de la reivindicación 1, en el que el mutante es un mutante nulo que carece de función *Ure2p*.
- 5 3. Uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que el mutante es un mutante de *Saccharomyces sp.* o de un híbrido interespecífico derivado.
4. Uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el mutante es un mutante de una cepa de levadura de vino.
5. Uso de la reivindicación 4, en el que la cepa de levadura de vino se selecciona del grupo constituido por: VL3c, X5 y RX60.
- 10 6. Uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el tior volátil aromático deriva de un precursor conjugado con S-cisteína.
7. Uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el tior volátil se selecciona del grupo constituido por: 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona (4MMP), 3-mercaptohexan-1-ol (3MH), 4-mercapto-4-metilpentan-2-ol (4MMPOH), acetato de 3-mercaptohexilo (3MHA), 3-mercaptopentan-1-ol (3MPOH), 3-mercaptoheptan-1-ol (3MHepOH), 3-mercapto-2-metilbutan-1-ol (3M2MBOH) y/o 3-mercapto-2-metilpentan-1-ol (3M2MPOH).
- 15 8. Uso de la reivindicación 7, en el que el 3MH que se libera mediante el mutante consiste de más enantiómero (*R*) que enantiómero (*S*).
9. Uso de la reivindicación 8, en el que el 3MH consiste de al menos el 70% de enantiómero (*R*).
10. Uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la liberación de tior volátil se incrementa al menos por un factor de 3.
- 20 11. Uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la fermentación es fermentación alcohólica.
12. Uso de la reivindicación 11, en el que el producto fermentado es una bebida alcohólica tal como vino.
13. Uso de la reivindicación 12, en el que el vino se prepara mediante fermentación de una variedad de uva no floral o simple seleccionada del grupo constituido por: Sauvignon blanc, Gewurztraminer, Riesling, Semillon, Colombard, Scheurebe, Petit Manseng, Cabernet Sauvignon y Merlot.
- 25 14. Procedimiento para potenciar el aroma de un producto fermentado producido mediante fermentación de un producto inicial que contiene al menos un precursor de tior no volátil, que comprende la incubación del producto inicial con una levadura mutante *URE2* tal como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, bajo condiciones que permiten que la fermentación mediante el mutante *URE2* se produzca y, por tanto, que incremente la liberación de tior(es) volátil(es) mediante la levadura mutante, durante la fermentación.
- 30 15. Procedimiento para potenciar el armónico de pomelo de un producto fermentado producido mediante fermentación de un producto inicial que contiene S-3-(hexan-1-ol)-L-cisteína (precursor de 3MH), que comprende la incubación del producto inicial con una levadura mutante *URE2* tal como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, bajo condiciones que permiten que la fermentación mediante el mutante *URE2* se produzca y, por tanto, que incremente la liberación del enantiómero 3MH (*R*), mediante la levadura mutante, durante la fermentación.
- 35 16. Procedimiento para la identificación de levaduras que pueden mejorar el aroma de un producto fermentado, que comprende al menos las etapas de:
 - (a) obtención de levaduras mutantes *URE2*,
 - (b) inoculación del/de los mutante(s) *URE2* de la etapa (a) en un medio de fermentación que contiene precursor(es) de tior(es) no volátil(es), bajo condiciones que permiten que la fermentación mediante el/los mutante(s) *URE2* se produzca y, por tanto, que libere el/los tior(es) volátil(es) mediante el mutante, durante la fermentación,
 - (c) medida del/de los tior(es) volátil(es) liberado(s) en el medio fermentado, mediante cualquier medio apropiado y
 - (d) identificación del/de los mutante(s) *URE2* que puede(n) liberar alto nivel de tior volátil, en comparación con
- 45 levadura que tiene un gen *URE2* de tipo salvaje en un precedente genético casi isogénico.

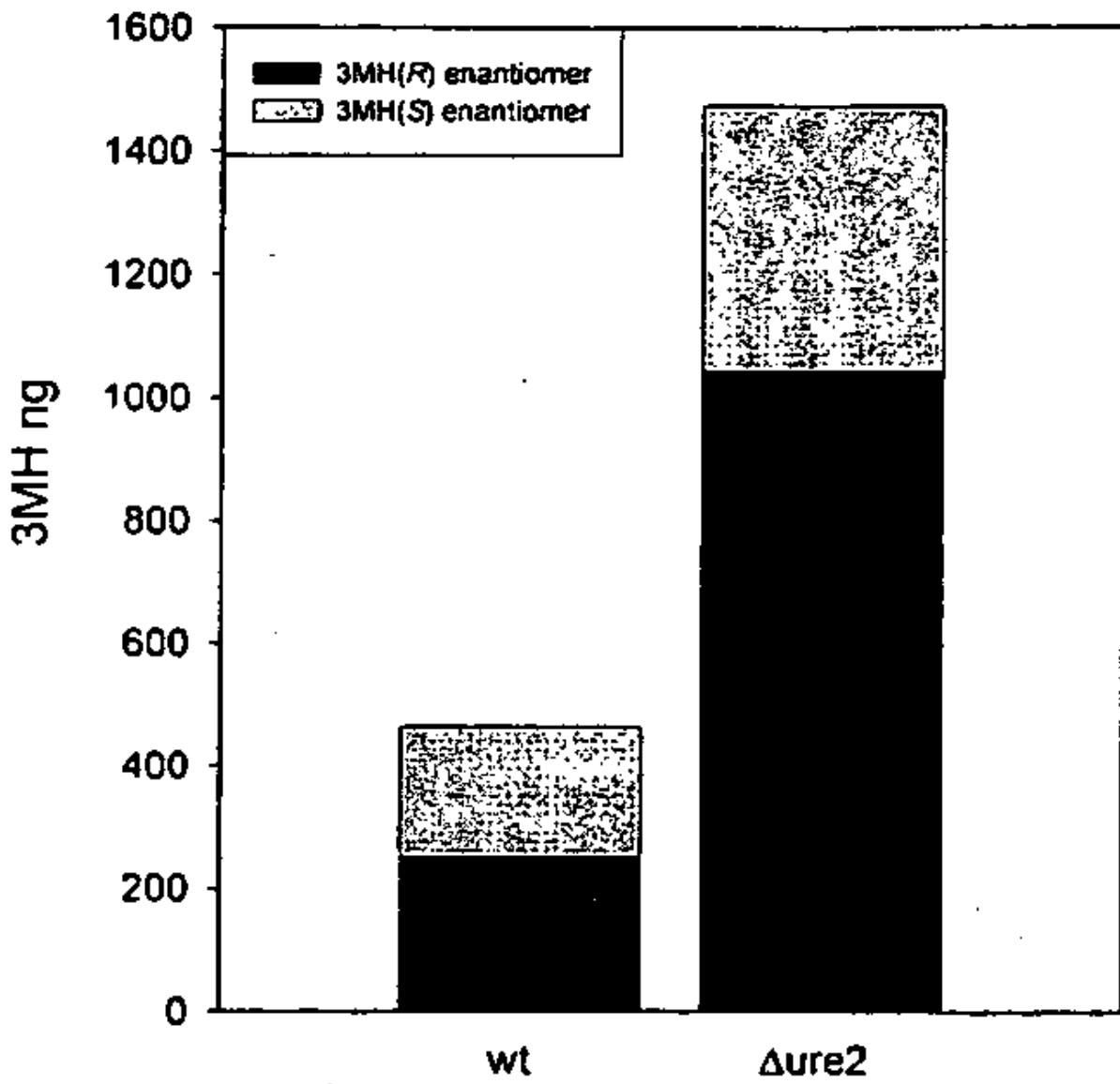


FIGURA 1

ES 2 371 472 T3

A

>ts *URE2* Chr 14 desde 219511 hasta 219856

AAAGCTTGTCCAATCATTGGCGCATGCCCTGACGTTTGGGAAGAACAACCATGCGTTGATT
TGTGATTGGTCAGCTAAATCATCGGACCAGAGTAATGGATTACCAGTCTCTTTGTAATAT
TTATTTACCAAATGTAATAAAATCGCCCTGATTCCCAAATAGACAAGTTGTCCATACCA
TGATCGATTAAAGCTGGAACTCTTGCATTAGGGTTCACAGACACAAATTCGGGGGCCCTA
TGTTGCGCCAAGATTGAAATCTAGGAAGATTGTGTTATAATGAAATCCAAGTTCACCTTAGT
ACTATAGCAACTTTGAATCCATTAGGCGCAGACCTGTGAGAGAAAA

5 B

>mutante *URE2* Chr 14 desde 219511 hasta 219856

AAAGCTTGTCCAATCATTGGCGCATGCCCTGACGTTTGGGAAGAACAACCATGCGTTGATT
TGTGATTGGTCAGCTAAATCATCGGACCAGAGTAATGGATTACCAGTCTCTTTGTAATAT
TTATTTACCAAATGTAATAAAATCGCCTGATTCCCAAATAGACAAGTTGTCCATACCA
TGATCGATTAAAGCTGGAACTCTTGCATTAGGGTTCACAGACACAAATTCGGGGGCCCTA
TGTTGCGCCAAGATTGAAATCTAGGAAGATTGTGTTATAATGAAATCCAAGTTCACCTTAGT
ACTATAGCAACTTTGAATCCATTAGGCGCAGACCTGTGAGAGAAAA

FIGURA 2

10

5