

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 736 652

②① N° d'enregistrement national : **95 08705**

⑤① Int Cl⁶ : C 12 N 15/52, 15/81, C 12 H 1/15(C 12 N 15/52,
C 12 R 1:865)

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 13.07.95.

③③ Priorité :

④③ Date de la mise à disposition du public de la
demande : 17.01.97 Bulletin 97/03.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : UNIVERSITE DE BOURGOGNE —
FR.

⑦② Inventeur(s) : GUZZO JEAN, LABARRE CECILE,
CAVIN JEAN FRANCOIS et DIVIES CHARLES.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire : CABINET CLAUDE GUIU.

⑤④ LEVURES ET BACTERIES TRANSFORMEES POUR OPERER LA FERMENTATION MALOLACTIQUE DANS
LES VINS.

⑤⑦ L'invention concerne le clonage et l'expression du
gène codant pour l'enzyme malolactique de *Leuconostoc
oenos* dans un microorganisme-hôte de préférence capa-
ble d'opérer simultanément la fermentation alcoolique et la
fermentation malolactique des vins, de manière à ce que
au moins 80% et de préférence au moins 90% de l'acide
malique présent soit dégradé en acide lactique. Le microor-
ganisme transformé appartient de préférence à l'espèce
Saccharomyces cerevisiae et plus particulièrement aux
souches de cette espèce possédant un transport trans-
membranaire amélioré du malate, ce caractère ayant été
acquis spontanément ou par clonage d'un gène codant
pour une malate perméase. L'invention concerne égale-
ment le clonage et l'expression du gène codant pour la ma-
late perméase de *Leuconostoc oenos*.

FR 2 736 652 - A1



- 1 -

LEVURES ET BACTÉRIES TRANSFORMÉES POUR OPÉRER
LA FERMENTATION MALOLACTIQUE DANS LES VINS

L'objet de la présente invention est relatif à des souches de bactéries ou de levures transformées de manière à opérer la fermentation malolactique dans les vins.

La fermentation malolactique fait suite à la
5 fermentation alcoolique réalisée par les levures *Saccharomyces cerevisiae* dans la production de différents types de vins. Cette fermentation correspond à la décarboxylation en une seule étape du L-malate en L-lactate et CO₂. Elle a pour conséquences une diminution
10 de l'acidité du vin, de favoriser la stabilité microbienne par épuisement des substrats et en général d'améliorer la qualité organoleptique du vin, bien que dans certains cas, cette fermentation bactérienne associée se révèle néfaste en raison des autres métabolites qu'elle produit.

15 Les bactéries lactiques des genres *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Lactococcus* sont capables de réaliser cette fermentation. Toutefois en milieu vin, l'espèce *Leuconostoc oenos* est la mieux représentée en raison de ses propriétés physiologiques telles que son
20 caractère acidophile et sa résistance à de fortes concentrations d'éthanol. L'enzyme malolactique de *Leuconostoc oenos* présente donc un intérêt tout particulier comparé aux enzymes malolactiques des bactéries lactiques de niches écologiques différentes et
25 moins acidophiles comme par exemple *Lactococcus*.

Par opposition à la fermentation alcoolique qui est maîtrisée, l'initiation de la fermentation malolactique est une étape mal contrôlée en vinification. Lorsque cette fermentation est désirée, un ensemencement à l'aide de
30 bactéries sélectionnées s'avère nécessaire. Cependant ce processus, qui n'est pas toujours efficace, est relativement coûteux et nécessite une période d'adaptation complexe et longue du ferment au milieu vin.

L'enzyme malolactique a été purifiée à partir des
35 souches de *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc oenos*,

Lactobacillus plantarum et *Lactococcus lactis*. Il s'agit d'une protéine multimérique constituée de deux ou quatre sous-unités de 60 à 70 kDa. La réaction enzymatique nécessite du NAD et du Mn^{2+} et comprend un stade de
5 décarboxylation du L-malate en pyruvate avec réduction du NAD et ensuite la transformation du pyruvate en L-lactate avec réoxydation du NADH en NAD. Chez *Leuconostoc oenos*, l'enzyme malolactique a un poids moléculaire apparent de 60 kDa et un point isoélectrique égal à 4,8. Le pH optimal
10 de l'enzyme se situe aux alentours de 5,5. Ces propriétés physico-chimiques montrent que cette enzyme est tout à fait adaptée aux conditions de croissance des microorganismes à pH acide. En effet, il a été montré que le pH interne, dans les conditions physico-chimiques du
15 vin des levures oenologiques de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* et de la bactérie *Leuconostoc oenos* avoisine une valeur de 5,6.

La construction d'une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* capable de réaliser les deux fermentations : la
20 fermentation alcoolique et la fermentation malolactique, est un objectif ancien de la recherche. On peut citer à cet égard :

- le brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 4 472 502. Les inventeurs ont isolé le gène malolactique de
25 *Lactobacillus delbrueckii* et l'ont cloné dans une levure *Saccharomyces cerevisiae*. Celle-ciensemencée dans un jus de raisin a transformé 1,5 % de l'acide L-malique présent en acide L-lactique, transformation insuffisante pour avoir un intérêt pratique.

30 - les demandes de brevet français n° 93 06003 et 93 06478. Les inventeurs ont isolé et séquencé le gène malolactique de *Lactococcus lactis* et l'ont cloné dans une levure *Saccharomyces cerevisiae*, les résultats obtenus conduisaient toujours à une transformation faible et
35 insuffisante de l'acide malique.

Jusqu'à maintenant, tous les essais d'isolation et de clonage du gène malolactique de *Leuconostoc oenos*, la bactérie lactique qui opère normalement la fermentation

malolactique dans les vins, avaient échoué. L'échec de ces travaux est notamment relaté dans "Cloning of malic acid assimilating activity from *Leuconostoc oenos* in *Escherichia coli*" A. Lautensach and R.E. Subden, Microbios 5 1984, 39, 29-39. Jusqu'à maintenant, à notre connaissance, aucun gène de *Leuconostoc oenos* codant pour une protéine d'intérêt biotechnologique n'avait été cloné et séquencé.

Un des objets de l'invention est le clonage et l'expression du gène malolactique de *Leuconostoc oenos*. Un 10 autre objet est son expression dans des souches de *Saccharomyces cerevisiae* susceptibles de dégrader au moins 80 % et de préférence au moins 90 % de l'acide malique présent. Un autre objet de l'invention est l'expression de ce gène dans des bactéries lactiques, ou 15 d'autres bactéries résistant à l'alcool et ne présentant pas les inconvénients des bactéries lactiques en vinification, ou encore la surexpression de ce gène dans *Leuconostoc oenos*.

Une description plus détaillée de l'invention est la 20 suivante.

L'isolement du gène malolactique et de la malate-perméase associée a été réalisé à partir de la souche de *Leuconostoc oenos* Lo 84-13 (Institut d'Oenologie de Bordeaux). Il sera fait référence dans ce qui suit aux 25 tableaux et aux figures dans lesquels :

- le tableau 1 (annexe 1) indique les souches de microorganismes et les plasmides utilisés.

- le tableau 2 (annexe 2) donne l'activité malolactique spécifique, en mg de L-lactate formé par mg 30 de protéine, trouvée dans la fraction protéique de minicellules d'*E. coli* AR 1062 après précipitation à 60 % de sulfate d'ammonium pour 15, 30 et 60 minutes d'incubation :

pJF119EH : minicellules transformées avec le 35 plasmide vide

pJFED6 : minicellules portant le gène MLEA de *Leuconostoc oenos*.

- le tableau 3 (annexe 3) donne l'activité malolactique de la souche de *Saccharomyces cerevisiae* RH 100-4 transformée avec le plasmide vide pYeDP1/8-2 et le plasmide pYMLEA portant le gène MLEA de *Leuconostoc*
5 *oenos*.

- la figure 1 décrit la carte de restriction des fragments d'ADN de *Leuconostoc oenos* Lo 84.13 insérés dans pJ6D5 (insert de 5,5 kb) et pJ2C3 (insert de 3 kb) couvrant une région de 3001 pb portant le gène de
10 structure MLEA de l'enzyme malolactique et le gène de structure MLEP de la perméase de l'acide malique (malate perméase).

- la figure 2 représente la séquence nucléotidique SEQ ID n°1 de 3001 pb ainsi que la séquence polypeptidique
15 déduite de cette séquence nucléotidique, de la région d'ADN de la souche Lo 84.13 de *Leuconostoc oenos* portant le gène de structure MLEA de l'enzyme malolactique et le gène de structure MLEP de la malate perméase.

- la figure 3 est un profil électrophorétique de
20 protéines radiomarquées au ³⁵S synthétisées dans les minicellules d'*E.coli* AR 1062 contenant pJF119EH (piste 1), pJFED6 en absence (piste 2) ou en présence d'ITPG (piste 3) ou pJFHD6 en absence (piste 4) ou en présence d'ITPG (piste 5). Le produit du gène MLEA est
25 indiqué par une flèche. La forme mature et les précurseurs de la β-lactamase et le produit d'expression du gène lacI^q sont également indiqués. Les nombres à gauche représentent les poids moléculaires standard.

- la figure 4 est un profil électrophorétique de
30 protéines radiomarquées au ³⁵S, synthétisées dans les minicellules d'*E.coli* AR 1062 contenant pJF119HE (piste 1) et pJFHC3 portant MLEP : sur protéines totales en absence d'ITPG (piste 2), et en présence d'ITPG sur protéines totales (piste 3), sur protéines périplasmiques (piste 4),
35 sur protéines cytoplasmiques (piste 5) et sur protéines membranaires (piste 6). Le produit du gène MLEP est indiqué par une flèche. La forme mature et les précurseurs de la β-lactamase et le produit d'expression du gène lacI^q

sont également indiqués. Les nombres à droite représentent les poids moléculaires standard.

- la figure 5 montre la cinétique d'entrée en fonction du temps du L-malate en nanomoles/mg de protéines dans des minicellules d'*E.coli* AR 1062 transformées avec le plasmide vide pJF119HE (carré noir) et le plasmide pJFHC3 portant MLEP (losange noir). Les cinétiques ont été menées en présence de valinomycine 4 μ M.

Les travaux de recherche ont abouti à l'obtention d'un fragment d'ADN de 3001 pb portant le gène de structure MLEA de l'enzyme malolactique et le gène de structure MLEP de la malate perméase. La partie codante du MLEA comporte 1626 nucléotides et code pour un polypeptide de 542 acides aminés. La partie codante du gène MLEP comporte 942 nucléotides et code pour un polypeptide de 314 acides aminés.

L'invention concerne d'une part toute fraction de l'acide nucléique précédent dont la séquence est modifiée, dès lors que le polypeptide codé par cette fraction d'acide nucléique présente au moins une activité enzymatique malolactique ou une activité malate perméase, ces séquences modifiées étant reconnaissables par le fait qu'elles sont capables de s'hybrider en conditions stringentes avec tout ou partie de l'ADN SEQ ID n°1, ces conditions stringentes correspondant de préférence à la recherche d'une homologie d'au moins 80 %.

De telles modifications, de manière non limitative, conduisent par exemple à des acides nucléiques variants qui se distinguent de l'acide nucléique de l'invention par addition et/ou suppression d'un ou de plusieurs nucléotides et/ou modifications d'un ou plusieurs nucléotides. Toutes utilisations de la région promotrice ou d'une partie de celle-ci en vue d'exprimer un polypeptide chez les bactéries comme par exemple les bactéries lactiques des genre *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* et *Lactococcus*, ou d'autres bactéries alimentaires ou GRAS (Generally Recognised As Safe), notamment les espèces *Bacillus subtilis* et *Escherichia*

coli GRAS (ex. *Escherichia coli* K12) entrent dans le cadre de cette invention.

L'invention a aussi pour objet toute séquence de polypeptide issue au moins partiellement de la séquence du polypeptide originel, dès lors que la protéine modifiée
5 possède au moins une propriété enzymatique malolactique ou malate perméase.

De manière non limitative, des polypeptides entrant dans le cadre de l'invention peuvent se distinguer de ceux
10 définis dans la figure 2 par addition et/ou suppression d'un ou de plusieurs acides aminés et/ou modification d'un ou plusieurs acides aminés, par exemple par les procédés consistant :

- à traiter le polypeptide originel avec une
15 protéase clivant le polypeptide au niveau de sites précis.

- à modifier le gène de structure par les outils de génie génétique (par exemple enzymes de restriction) afin d'obtenir un polypeptide tronqué.

L'invention a aussi pour objet tout acide nucléique
20 recombinant comprenant au moins une séquence nucléotidique du type sus-indiqué codant pour l'enzyme malolactique associée et/ou la malate perméase associée avec au moins un promoteur et/ou un terminateur de transcription reconnu par les polymérases de l'hôte dans laquelle ledit acide
25 nucléique recombinant est introduit.

L'acide nucléique peut être maintenu sur un vecteur permettant l'expression de l'enzyme ou être introduit directement dans le génome par des techniques de génie génétique.

30 Les microorganismes hôtes dans lesquels l'acide nucléique recombinant est susceptible d'être introduit sont préférentiellement des cellules procaryotes appartenant aux genres *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* ou *Escherichia*, mais
35 peuvent être aussi des eucaryotes comme les levures.

Tout particulièrement, l'utilisation d'un ferment composé de microorganismes, dans lesquels a été introduit un acide nucléique tel que défini ci-dessus en vue de

réaliser la fermentation malolactique dans des produits agro-alimentaires et notamment les boissons fermentées, fait partie de l'invention.

L'objet principal de l'invention est l'expression du
5 gène de structure de l'enzyme malolactique de *Leuconostoc oenos* dans des souches de *Saccharomyces cerevisiae* transformées ou non pour lesquelles l'entrée de l'acide malique dans la cellule n'est pas un facteur limitant à la transformation de l'acide malique présent en acide
10 lactique.

De telles souches sont par exemple :

- de préférence des souches de *Saccharomyces cerevisiae* dans lesquelles a été cloné et s'exprime au moins un gène codant pour une malate perméase, comme par
15 exemple le gène codant pour la malate perméase de *Schizosaccharomyces pombe* ou d'autres espèces de levures performantes dans l'utilisation du malate. On peut citer comme autre gène codant pour une malate perméase celui de *Leuconostoc oenos* qui est un des objets de l'invention.
20 Ces transformations supposent que ces gènes de structure ont été mis sous promoteur fort de *Saccharomyces cerevisiae* comme par exemple les promoteurs PGK ou ADH1, et éventuellement en cas de transformation par un ou des gènes de bactéries lactiques, que ceux-ci aient été
25 associés ou fusionnés avec une séquence signal dirigeant le produit d'expression vers les membranes ou avec un gène codant pour une protéine membranaire

- ou encore des souches de *Saccharomyces cerevisiae* présentant un transport du malate soit par diffusion
30 facilitée (mutant de perméation) soit du fait qu'elles possèdent des perméases d'acides organiques peu spécifiques. De telles souches peuvent être sélectionnées parmi les souches de *Saccharomyces cerevisiae* dites "démaliquantes" capables de transformer une grande partie
35 de l'acide malique en alcool, souches qui sont en général trop déacidifiantes pour l'élaboration des vins.

De préférence, toutes les transformations seront faites par intégration de l'ADN recombinant codant pour

les propriétés ajoutées et strictement limitées à cet ADN en absence de tout gène marqueur hétérologue. L'invention concerne donc spécifiquement des souches de *Saccharomyces cerevisiae* transformées pour exprimer à la fois au moins
5 un gène codant pour une malate perméase et au moins un gène codant pour l'enzyme malolactique. L'invention vise également des bactéries transformées pour exprimer à la fois ces 2 types de gènes.

De plus l'invention concerne aussi l'exploitation de
10 l'acide nucléique défini ci-dessus en vue d'une production de l'enzyme malolactique par un quelconque procédé biotechnologique à un niveau industriel.

L'invention pourra être mieux comprise à l'aide des exemples suivants qui ne sont pas limitatifs.

15 **EXEMPLE 1 : Isolement, séquençage et identification des gènes MLEA et MLEP de *Leuconostoc oenos***

1) Matériel et méthodes

a) Souches et plasmides utilisés

Les souches de microorganismes et les plasmides
20 utilisés pour le clonage des gènes sont donnés dans le tableau 1.

La souche *Leuconostoc oenos* Lo 84-13 a été cultivée à 30°C sur un milieu FT80 modifié (Extrait de viande 5g/l; Extrait de levure 4g/l; KH₂PO₄ 0,6 g/l; KCl 0,45 g/l;
25 CaCl₂.2H₂O 0,13 g/l; MgSO₄.7H₂O 0,13 g/l; MnSO₄.H₂O 0,003 g/l; Tween 80 1 ml; Acide malique 10 g/l; D-fructose 4 g/l et D-glucose 1 g/l). *Escherichia coli* TGI (Gibson, T.J., PD Thesis, Cambridge University 1984) et AR 1062 (D'Enfert et al, Embo J. 1987, 6, 3531-8) ont
30 été cultivés sur milieu Luria-Bertani (LB) ou sur milieu minimum M9 à 37°C. Si nécessaire, de l'ampicilline (50 µg/ml) ou de l'érythromycine (200 µg/ml) sont ajoutés dans les cultures d'*E.coli*. La souche de levure RH100-4 (Nuoffer et al., Mol. Cell. Biol. 1991, 11, 27-37) a été
35 cultivée sur milieu YPD ou YPG (1 % d'extrait de levure, 2 % en bacto-peptone, 2 % glucose ou galactose) à 30°C ou sur milieu semi-synthétique (0,67 % "yeast

nitrogen base" Difco sans acides aminés, 2 % glucose ou galactose).

b) Clonage moléculaire et manipulation d'ADN

Les plasmides et l'ADN chromosomique ont été
5 préparés selon les techniques connues (Maniatis et al.,
Molecular cloning : A laboratory manual, Cold Spring
Harbor Laboratory Press 1982). La transformation des
cellules d'*E.coli* a été réalisée selon une procédure
standard au TSB (Chung et Miller, Nucleic acids res.,
10 1988, 16, 3580). La méthode utilisée pour la
transformation de la levure est celle à l'acétate de
lithium décrite par Gietz et Schiestl, (Yeast 1991, 7,
253-263). Les southern blots, les hybridations d'ADN et
d'une façon générale, toutes les autres techniques de
15 Biologie Moléculaire (PCR, analyse de restriction) ont été
réalisées comme décrit par Maniatis et al. (ibid).

c) Détermination de la séquence d'ADN

Les clones d'*E.coli* XL1 blue (Bullock et al,
Biotechniques, 1987, 15, 376) mis en oeuvre pour le
20 séquençage ont été obtenus par sous-clonage de fragments
d'ADN dans les plasmides de la famille pBluescript.

Les acides nucléiques double brin ont été purifiés à
l'aide du Kit Qiagen - Tip 100 (Diagen) et dénaturés
pendant 4 minutes par chauffage à 100°C puis rapidement
25 refroidis dans l'azote liquide pendant 45 secondes. Les
réactions de séquence ont été réalisées selon la méthode
de Sanger avec le Kit de séquençage T7 de Pharmacia.

Les séquences nucléotidiques ont été déterminées sur
les deux brins.

30 **2) Isolement des fragments d'ADN portant le gène de
structure de l'enzyme malolactique et le gène de structure
de la malate perméase**

**a) Construction de la banque génomique de
Leuconostoc oenos et criblage de la banque**

35 L'ADN total de *Leuconostoc oenos* a été partiellement
digéré avec l'endonucléase *Sau3A* et séparé selon la taille
sur gradient de saccharose 10-40 %. Les fractions
contenant les fragments d'ADN de 5 à 10 kb ont été

identifiées sur gel d'électrophorèse 0,6 % et utilisés pour construire la banque génomique.

Le vecteur pJDC9 (Chen et Morrisson, Gene, 1988, 64, 155-64) a été digéré par *Bam*H1 et déphosphorylé au moyen
5 de la phosphatase alcaline bovine (Boehringer). Le vecteur et l'ADN génomique hydrolysé par *Bam*H1 ont été ligaturés selon un rapport molaire insert-vecteur d'approximativement 3:1. Le mélange ligaturé a été utilisé pour transformer *Escherichia coli* TGI.

10 Les clones de la banque (2990 clones) ont été cultivés sur membranes de nylon placés sur boîte de Pétri à 37°C pendant une nuit. Les filtres portant les colonies sont traités pour lyser les cellules et l'ADN est dénaturé et fixé à la membrane selon le protocole suivant:

- 15 - Lyse avec SDS 10 %
 - Dénaturation avec NaOH 0,5M; NaCl 1,5 M; 5 minutes
 - Neutralisation avec 0,2 M Tris pH 7.5, 2 x SSC
2 fois 15 minutes
 - Digestion à la protéinase K, 100 µg/ml 15 minutes
20 à 37°C
 - Fixation de l'ADN 2 h à 80-85°C

Le marquage de la sonde, les étapes d'hybridation, de détection et de révélation sont réalisés avec le Kit DIG de marquage et de détection de Boehringer selon le
25 protocole standard préconisé par le fournisseur.

b) Amplification par PCR et clonage des gènes de structure de l'enzyme malolactique et de la malate perméase

Deux amorces oligonucléotidiques dégénérées ont été
30 synthétisées à partir de deux régions très conservées présentes dans la séquence de protéines enzymatiques utilisant le NADH comme cofacteur et utilisant l'acide malique comme substrat. La première région de séquence Ile-Leu-Gly-X-Gly-Asp-Y-Gly (où X = Ile ou leu et Y = Trp,
35 Gln ou leu) correspond au site d'attache du NAD à la protéine enzymatique. La seconde région correspond à une séquence d'acides aminés (Phe-Asn-Asp-Asp-Ile-Gln-Gly-Thr)

très conservée de fonction non encore connue trouvée dans la famille des enzymes maliques (malate déshydrogénase).

Les deux amorces ont été utilisées pour amplifier un fragment du gène de l'enzyme malolactique de *Leuconostoc*
 5 *oenos* à partir de l'ADN total isolé de cette souche ; la taille du fragment amplifié est de 324 paires de bases.

Les deux amorces (SEQ ID n°2 et SEQ ID n°3) de 24 acides nucléiques de séquence suivante ont été employées :

- SEQ ID n°2 : 5'-ATHYTNGGNATHGGNGAYTGGGGN-3'
 10 correspondant à la première région conservée
 - SEQ ID n°3 : 5'-NGTNCCYTGDATRTCRTCTTAA-3'
 correspondant à la seconde région conservée

dans ces séquences, R = A ou G ; Y = C ou T ; H = A, T ou C ; N = A, G, C ou T.

15 L'amplification a été réalisée comme suit :

Amorce SEQ ID n°2 1,3 µl (20 pmoles)
 Amorce SEQ ID n°3 1,4 µl (20 pmoles)
 Taq Buffer 10 x (Eurogentec) 10 µl
 Taq (Eurogentec) 0,5 µl (5 U/µl)
 20 dNTP (4 mM) 5 µl
 ADN *Leuconostoc oenos* 5 µl (50 ng)
 H₂O 57 µl
 MgCl₂ 25 (mM) 8 µl (2 mM)

Conditions d'amplification :

25 40 secondes à 92°C, 1 min à 37°C, 1 min à 72°C pendant 35 cycles, sur amplificateur Hybaid Omnigène.

Le produit d'amplification est analysé sur gel d'agarose 1,2 % et la bande correspondante (324 pb) prélevée et purifiée par le Kit Prep A (Biorad).

30 Après remplissage des extrémités à la Klenow (BRL), le fragment amplifié a été dans un premier temps ligaturé au site *Sma*I du plasmide pBluescript et séquencé pour contrôle.

Ce fragment interne du gène de l'enzyme malolactique
 35 a été utilisé comme sonde pour la recherche du gène complet dans la banque génomique réalisée chez *Escherichia coli*.

Des expériences d'hybridation sur colonies ont permis de mettre en évidence 7 clones donnant un signal d'hybridation.

Deux d'entre eux ont été étudiés de façon plus approfondie : les clones TGI/pJ6D5 et TGI/pJ2C3 décrits dans la figure 1.

3) Séquence nucléotidique des gènes MLEA et MLEP et identification de leur produit d'expression

La séquence d'une région de 3001 nucléotides a été déterminée à partir de pJ6D5 et pJ2C3 dont les cartes de restriction sont présentées dans la figure 1. Cette séquence est indiquée figure 2 et notée comme SEQ ID n°1. Elle comporte 2 phases de lecture ouverte (ORF).

Une analyse informatique avec PC-Gene et Geneworks a montré que la première phase de lecture ouverte a une taille de 1626 pb codant pour une protéine de 542 acides aminés. Le codon d'initiation ATG est précédé par un site possible de fixation de ribosome qui présente des similitudes de séquences avec les séquences consensus des RBS décrites chez *E.coli* et *Lactococcus lactis*. Le poids moléculaire prédit de la protéine codée par cette première phase est de 59 kDa et correspond à celui de la protéine purifiée à partir de *Leuconostoc oenos* (Batterman et Radler, Can. J. Microbiol. 1990, 37, 211-7) estimé sur gel SDS-PAGE à 60 kDa.

De plus, le point isoélectrique déduit de la séquence protéique est de 4,55 et apparaît tout à fait compatible avec celui déterminé par électrofocalisation (pHi 4,8) à partir de la protéine de *Leuconostoc oenos*.

Pour confirmer le clonage, des expériences en minicellules, permettant d'identifier les protéines codées par la fraction de DNA séquencée, ont été entreprises. Pour ce faire, un fragment *EcoRI-SalI* de 2,7 kb issu de pJ6D5 a été inséré dans les deux orientations sous le promoteur *tac* en utilisant les vecteurs d'expression pJF119EH et pJF119HE (Furste et al, Gene 1986, 48, 119-131) pour obtenir les plasmides pJFED6 et pJFHD6. Ces plasmides ont servi à transformer une souche d'*E.coli*

AR 1062. Le résultat est présenté figure 3. L'expérimentation a permis de mettre en évidence chez *E.coli* le produit d'expression du gène cloné qui correspond bien à une protéine de poids moléculaire égal
5 à 60 kDa. Une activité malolactique 10 fois supérieure à celle du témoin (tableau 2) a été également mise en évidence chez les minicellules exprimant le gène cloné.

L'absence d'un signal d'arrêt de transcription après la première ORF et l'existence d'une seconde phase de
10 lecture ouverte (ORF) de 942 nucléotides, détectée au niveau du codon stop du premier ORF, suggèrent l'existence d'une structure opéronique. La séquence de 314 acides aminés déduite de ce second ORF indique que ce gène code pour une protéine de poids moléculaire 34190 Da. Cette
15 protéine possède 59 % de résidus non polaires et 41 % de résidus polaires dont 65 % sont basiques, donnant à la protéine un pI théorique de 10,1.

L'analyse informatique du second ORF comparativement aux protéines de séquence connue présentes dans les bases
20 de données, montre une similitude significative avec d'autres protéines membranaires. Le profil d'hydrophobicité de la protéine codée par ce second ORF montre une structure caractéristique de protéine
membranaire qui a déjà été observée chez des transporteurs
25 de glucose ou de citrate, avec des segments hydrophobes organisés autour d'un noyau hydrophile. Le produit d'expression du gène de ce second ORF possède 10 segments hydrophobes entourant un noyau hydrophile de 24 acides aminés. Cette organisation est typique des protéines
30 catalysant le transport transmembranaire de composés organiques ou inorganiques.

Un fragment *SalI*-*XbaI* de 1,6 kb issu de pJ2C3 a été inséré dans les 2 orientations, sous promoteur *tac* en utilisant les vecteurs d'expression pJF119EH et pJF119HE
35 pour obtenir les plasmides pJFEC3 et pJFHC3. Après transformation d'*E.coli* AR 1062, les minicellules portant pJFHC3 ont exprimé une protéine de poids moléculaire apparent de 20 kDa qui a été localisée dans le cytoplasme

et dans les membranes des minicellules (figure 4). Afin de déterminer si le produit d'expression du gène du second ORF code bien pour une activité malate perméase, des mesures de transport transmembranaire du L-malate ont été effectuées sur minicellules.

Les minicellules ont été incubées pendant 1 h en présence d'IPTG 1mM afin d'induire l'expression du gène malate perméase supposé. Après lavage en tampon phosphate 50mM pH 4,5, les cellules sont concentrées à $DO_{600nm} = 5$ dans un tampon phosphate 50mM, 10mM $MgSO_4$ pH 4,5. De la valinomycine est alors introduite dans le milieu réactionnel en quantité suffisante pour obtenir une concentration finale de 4 μM . Les minicellules sont incubées 5 minutes puis mises en présence de glucose (quantité suffisante pour obtenir 10 mM en concentration finale). Après 1 minute d'incubation, 1,4 μ curie de L-malate radiomarké au ^{14}C est ajouté dans le milieu réactionnel. Les cinétiques de transport sont mesurées selon le protocole de Olsen et al (J. bacteriol.1991, 173, 6199-6206). La figure 5 montre que l'entrée du L-malate est nettement supérieure chez les cellules transformées portant le gène du second ORF. Ce gène, nommé MLEP, code bien pour une protéine catalysant le transport transmembranaire de l'acide malique.

25 **EXEMPLE 2 : Expression de l'enzyme malolactique de *Leuconostoc oenos* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae***

Dans le but d'étudier l'expression du gène MLEA codant pour l'enzyme malolactique de *Leuconostoc oenos* chez une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae*, la souche RH100-4 a été choisie. Pour ce faire, la partie codante du gène MLEA a été préalablement amplifiée par PCR à partir du plasmide pJF119ED6, en utilisant des amorces incluant un site de restriction *KpnI* ou *EcoRI* afin de faciliter le clonage ultérieur du gène dans les vecteurs.

35 Les amorces suivantes ont été utilisées :

SEQ ID n° 4 : 5'-GTTCTTGGGTACCAAATATGACAGATC-3'

SEQ ID n° 5 : 5'-AAAGAATTCATTAGTATTTCCGATCCC-3'

Les sites *KpnI* et *EcoRI* sont soulignés. La PCR a été effectuée selon le protocole décrit plus haut, avec les paramètres suivants : 1 min à 92°C, 4 min à 30°C et 3 min à 72°C.

5 Le gène MLEA a été inséré grâce aux sites de restriction uniques introduit par PCR, dans le vecteur d'expression pYDP1/8-2 (Cullin et al., Gene, 1988, 65, 203-17) et le plasmide recombinant pYMLEA ainsi obtenu a été introduit dans la levure par transformation. Les
10 transformants ont été sélectionnés sur milieu glucosé dépourvu d'uracile puis repiqués sur le même milieu.

L'activité malolactique de la souche de levure RH100-4 transformée au moyen du plasmide pYMLEA portant le gène codant pour l'enzyme malolactique de *Leuconostoc*
15 *oenos* a été mesurée par comparaison avec une souche témoin transformée avec un plasmide vide (pYDP1/8.2).

Les levures ont servi à inoculer un milieu YPG à 20 g/l de galactose et 10 g/l de L-malate. La culture a été menée à 30°C, pH 3.1 pendant 48 h dans des fioles de
20 Erlenmeyer agitées. La teneur en L-malate résiduel et la teneur en L-lactate formé ont été mesurés au temps initial, après 24 h d'incubation et après 48 h. Les résultats sont donnés dans le tableau 3 où R est le rapport molaire L-lactate formé/L-malate consommé. Ce
25 rapport est peu différent de 1, signe qu'une activité malolactique vraie s'est développée.

Les résultats du tableau confirment que la souche transformée portant le plasmide pYMLEA possède une activité malolactique très significativement supérieure à celle du
30 témoin, mais encore loin du niveau nécessaire dans la pratique, le facteur limitant étant la vitesse de pénétration du L-malate dans la cellule.

En conséquence, les mêmes constructions ou des constructions similaires avec notamment des vecteurs
35 intégrables doivent être réalisées sur des souches de *Saccharomyces cerevisiae* pour lesquelles la pénétration du malate n'est pas limitante, par exemple :

- souches de *Saccharomyces cerevisiae* transformées avec le gène codant pour la malate perméase de *Schizosaccharomyces pombe* ou d'autres espèces de levures performantes dans l'utilisation du malate, mis sous
5 promoteur fort levure

- souches de *Saccharomyces cerevisiae* transformées avec le gène MLEP codant pour la malate perméase de *Leuconostoc oenos* sous promoteur fort levure, ce gène étant de plus éventuellement associé avec une séquence
10 signal de *Saccharomyces cerevisiae* dirigeant le produit d'expression vers les membranes ou fusionné avec un gène codant pour une protéine membranaire de *Saccharomyces cerevisiae*

- souches de *Saccharomyces cerevisiae* dites
15 "démaliquantes" capables de convertir l'acide malique en éthanol

- souches de *Saccharomyces cerevisiae* possédant une ou des perméases mutées capables d'effectuer le transport transmembranaire des ions organiques de manière non
20 spécifique

l'ensemble de ces constructions relevant du travail normal de l'homme de l'art.

Comme il résulte de ce qui précède, l'invention n'est pas limitée aux exemples et englobe notamment :

25 - Les souches de *Leuconostoc oenos* surexprimant, éventuellement de manière dérégulée, un ou plusieurs gènes codant pour une malate perméase et/ou une enzyme malolactique de manière à remédier aux difficultés actuelles d'emploi de *Leuconostoc oenos* en vinification.

30 - Les bactéries transformées exprimant au moins un gène codant pour une malate perméase et/ou le gène codant pour l'enzyme malolactique de *Leuconostoc oenos*.

- Les souches de *Saccharomyces cerevisiae* transformées de manière à opérer au moins 80 % et de
35 préférence au moins 90 % de la transformation de l'acide malique présent dans les moûts servant à l'élaboration de boissons fermentées comme par exemple le vin en acide lactique, et notamment les souches de *Saccharomyces*

cerevisiae exprimant à la fois un ou plusieurs gènes codant pour une malate permease et un ou plusieurs gènes codant pour une enzyme malolactique.

- les procédés de transformation desdites souches,
- 5 les boissons fermentées obtenues à partir desdites souches, la préparation d'enzyme malolactique à partir desdites souches et les enzymes malolactiques ainsi produites

ANNEXE 1**Tableau 1. Souches et plasmides utilisés**

5			
	Souches	Caractéristiques	Références ou sources
	<i>E.coli</i> TGI	<i>supE hsdΔ5 thiΔ (lac⁻ proAB)</i> <i>F'(traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15)</i>	Gibson (1984)
10	<i>E.coli</i> XL1 Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1</i> <i>thi gyrA46 thi lac⁻ F'(proAB⁺ lacI^q lacZΔM15) Tn10(tet^r)</i>	Bullock et al. (1987)
15	<i>E.coli</i> AR1062	<i>F⁻ thr leu ara azi fhuA lacY tsx</i> <i>minA gal rpsL xyl mtl thi hsdR</i>	D'Enfert et al. (1987)
	<i>Leuconostoc oenos</i> Lo 84.13	MLE ⁺ (type sauvage)	Institut d'Oenologie de Bordeaux
20	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RH 100-4	MATa <i>ura3 his3 bar1-1</i> <i>suc2Δ9</i>	Nuoffer et al. (1991)
25	Plasmides	Caractéristiques	Références ou sources
	pJDC9	<i>Em^r.ΔlacZ</i> (6.95kb)	Chen and Morrisson (1988)
30	pJ6D5	Fragment <i>Sau3A</i> de 5,5 kb du chromosome de <i>Leuconostoc oenos</i> Lo84.13 dans pJDC9	ce travail
35	pJ2C3	Fragment <i>Sau3A</i> de 3 kb du chromosome de <i>Leuconostoc oenos</i> Lo84.13 dans pJDC9	ce travail
40	pBluescript SK + pJF119EH/pJF119HE	<i>Amp^r</i> , 2.96kb, <i>lacZ</i> reporter gene, M13 ori, pBR322 ori <i>lacI^q rrnB Amp^r</i> (vecteur d'expression avec promoteur <i>tac</i>)	Stratagene Furste et al (1986)
45	pJFED6/pJFHD6	Fragment <i>EcoRI-PstI</i> de 2,7 kb issu de pJ6D5 inséré dans les 2 orientations dans pJF119EH/pJF119HE	ce travail
50	pJFEC3/pJFHC3	Fragment <i>SaI-XbaI</i> de 1,6 kb issu de pJ2C3 inséré dans les 2 orientations dans pJF119EH/pJF119HE	ce travail
	pYeDP1/8-2	Vecteur d'expression de levure <i>Amp^r ura3</i>	Cullin et Pompon (1988)
55	pYMLEA	pYeDP1/8-2 portant le gène MLEA	ce travail

ANNEXE 2**Tableau 2. Expression du gène MLEA dans *E.coli* AR 1062****(Activité spécifique en mg de L-lactate formé par mg de protéine)**

5

temps en minute	pJF119EH (plasmide vide)	pJFED6 (avec le gène MLEA)
15	0.05	0.18
30	0.03	0.26
60	0.03	0.42

Tableau 3 : Activité malolactique chez la levure RH 100-4 transformée au moyen des plasmides pYeDP1/8.2 et pYMLEA

10

Levure	pYeDP1/8-2 (témoin)			pYMLEA		
Temps (h)	0	24	48	0	24	48
DO 600 nm	2,68	70,2		1,84	6	
Biomasse g/l	1,2	3,16		0,8	2,7	
g/l L-malate résiduel mM	10 75	9,7 72	9,2 69	10 75	9,2 69	7,9 59
g/l L-lactate formé mM		0,14 1,5	0,15 1,6		0,52 5,8	1 11
L-malate consommé g/l (pYMLEA-témoin) mM	-	-	-	-	0,5 3,7	1,3 9,7
L-lactate formé g/l (pYMLEA-témoin) mM	-	-	-	-	0,38 4,2	0,85 9,4
R = «CHAMP_NON_VALIDE: Objet»	-	-	-	-	1,13	0,97

REVENDICATIONS

1 - Séquence d'ADN comprenant un gène ou une partie
d'un gène codant pour une enzyme malolactique et/ou un
5 gène ou une partie d'un gène codant pour une malate
perméase, consistant en :

- a) tout ou partie de la séquence d'ADN SEQ ID n°1,
- b) toute séquence d'ADN capable d'hybrider sous
conditions stringentes avec la séquence de a) et codant
10 pour une enzyme malolactique ou une malate perméase
- c) une séquence d'ADN codant pour une séquence
d'acides aminés identique aux séquences d'acides aminés
codées par a) ou b)

2 - Séquence d'ADN selon la revendication 1 isolée
15 de *Leuconostoc oenos*.

3 - Vecteur de transformation capable de transformer
une cellule hôte, ledit vecteur contenant tout ou partie
d'une séquence d'ADN définie selon l'une des
revendications 1 ou 2.

20 4 - Vecteur de transformation selon la
revendication 3 où le gène codant pour l'enzyme
malolactique est placé sous contrôle de promoteurs et de
terminateurs permettant une expression forte de ces gènes
dans la cellule hôte.

25 5 - Vecteur de transformation selon la
revendication 3 où le gène codant pour la malate perméase
est placé sous contrôle de promoteurs et de terminateurs
permettant une expression forte de ces gènes dans la
cellule hôte.

30 6 - Vecteur de transformation selon l'une des
revendications 3 à 5 de type intégratif.

7 - Microorganisme transformé au moyen d'au moins
une séquence d'ADN selon l'une des revendications 1 ou 2.

8 - Microorganisme transformé au moyen d'au moins un
35 vecteur selon l'une des revendications 3 à 6.

9 - Souche de *Saccharomyces cerevisiae* caractérisée
par le fait qu'elle est capable de transformer au moins

80 % et de préférence au moins 90 % de l'acide malique présent dans les moûts viniques en acide lactique.

10 - Souche de *Saccharomyces cerevisiae* selon l'une des revendications 7 à 9 caractérisée par le fait qu'elle
5 possède un transport transmembranaire passif ou facilité (mutant de perméation) non limitant de l'acide malique.

11 - Souche de *Saccharomyces cerevisiae* selon l'une des revendications 7 à 10 caractérisée par le fait qu'elle possède un transport transmembranaire actif de l'acide
10 malique.

12 - Souche de *Saccharomyces cerevisiae* selon l'une des revendications 7 à 11 caractérisée en ce qu'elle exprime à la fois au moins un gène codant pour une malate perméase et au moins un gène codant pour une enzyme
15 malolactique.

13 - Souche de *Saccharomyces cerevisiae* selon la revendication 12 caractérisée en ce qu'elle est capable d'exprimer au moins un gène codant pour la malate perméase de *Leuconostoc oenos*.

20 14 - Souche de *Saccharomyces cerevisiae* selon la revendication 12 caractérisée en ce qu'elle est capable d'exprimer au moins un gène codant pour la malate perméase de *Schizosaccharomyces pombe* ou d'autres espèces de levures performantes dans l'utilisation du malate

25 15 - Souche de bactérie transformée selon l'une des revendications 7 ou 8 de manière à transformer au moins 90 % de l'acide malique présent dans les moûts viniques en acide lactique.

16 - Procédé de transformation d'un microorganisme,
30 notamment du type susceptible d'être utilisé comme ferment ou levain pour l'élaboration des boissons fermentées, caractérisé en ce que l'on introduit dans ledit microorganisme au moins un acide nucléique selon les revendications 1 à 2.

35 17 - Procédé de transformation d'un microorganisme, notamment du type susceptible d'être utilisé comme ferment ou levain pour l'élaboration des boissons fermentées, caractérisé en ce que l'on introduit dans ledit

microorganisme au moins un vecteur selon les revendications 3 à 6.

18 - Utilisation des souches selon les revendications 7 à 15 pour l'élaboration de boissons
5 fermentées

19 - Utilisation des souches selon les revendications 7 à 15 pour la fabrication d'enzyme malolactique.

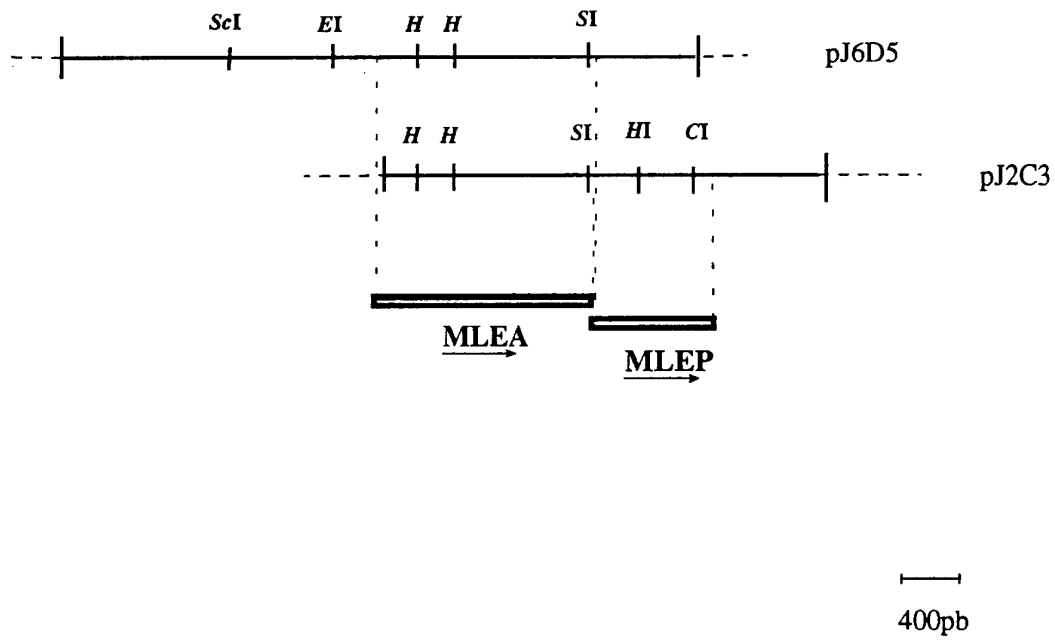
FIGURE 1

FIGURE 2 - 1/4

Planche 2/8

SEQ ID NO:1

- Longueur : 3001 paires de bases

- Type : ADN

- Séquence codant pour l'enzyme malolactique (de 364 à 1989)
et la malate perméase (de 1989 à 2933) de *Leuconostoc oenos*.

GAATTC	CAATG	TTGGTT	GATT	CATTCG	GTCA	ATTTCT	TTCGT	GGCGG	CAAC	CAC	TCT	TTGA	60			
AGAAT	TTTTTT	TGGCGT	GT	TTT	CAAA	AACT	TTCCAG	CTT	CCGTCA	AAGA	AATCT	CGCCA	120			
TGCGAC	CGAT	TGCGAT	TAA	TAGAG	TTTT	TT	CATCT	CGT	TTTCT	AAACG	CTGA	ATGGCA	180			
AAGGAA	ATTG	TCGGTT	GACT	GACATT	GTAAA	AAA	ATAG	CTG	TTTTT	GTAAA	GGATT	CAAGT	240			
TCGATA	AACT	TGTCGA	AGTA	TTCGAT	ATCG	GTGA	ATTT	TCA	TATA	AGATAA	TTTTAT	CTCT	300			
TTTATA	AGTT	TTGACT	TATAT	TAATC	CTAAT	GGAAT	ATGAT	AATGT	TGGT	TC	TTGAG	GAGAA	360			
AAT	ATG	ACA	GAT	CCA	GTA	AGT	ATT	TTA	AAT	GAT	CCT	TTT	ATT	AAC	AAA	408
	MET	Thr	Asp	Pro	Val	Ser	Ile	Leu	Asn	Asp	Pro	Phe	Ile	Asn	Lys	
	1				5				10					15		
GGA	ACT	GCT	TTT	ACG	GAA	GCG	GAG	AGA	GAG	GAG	CTT	GGT	TTA	AAC		453
Gly	Thr	Ala	Phe	Thr	Glu	Ala	Glu	Arg	Glu	Glu	Leu	Gly	Leu	Asn		
				20				25					30			
GGT	TTA	TTA	CCG	GCC	AAG	GTT	CAG	GCT	TTA	CAA	GAG	CAA	GTT	GAT		498
Gly	Leu	Leu	Pro	Ala	Lys	Val	Gln	Ala	Leu	Gln	Glu	Gln	Val	Asp		
				35				40					45			
CAG	ACT	TAT	GCT	CAA	TTT	CAA	AGC	AAG	GTT	TCA	AAT	CTC	GAA	AAA		543
Gln	Thr	Tyr	Ala	Gln	Phe	Gln	Ser	Lys	Val	Ser	Asn	Leu	Glu	Lys		
				50				55					60			
CGA	TTG	TTT	TTA	ATG	GAA	ATA	TTC	AAT	ACG	AAT	CAC	GTG	TTG	TTT		588
Arg	Leu	Phe	Leu	MET	Glu	Ile	Phe	Asn	Thr	Asn	His	Val	Leu	Phe		
				65				70					75			
TAT	AAG	CTT	TTT	TCT	CAA	CAT	GTT	GTT	GAA	TTT	ATG	CCA	ATT	GTT		633
Tyr	Lys	Leu	Phe	Ser	Gln	His	Val	Val	Glu	Phe	MET	Pro	Ile	Val		
				80				85					90			
TAT	GAC	CCG	ACA	ATT	GCT	GAT	ACA	ATT	GAA	AAT	TAT	TCG	GAA	TTA		678
Tyr	Asp	Pro	Thr	Ile	Ala	Asp	Thr	Ile	Glu	Asn	Tyr	Ser	Glu	Leu		
				95				100					105			
TTT	GTT	GAA	CCG	CAA	GGT	GCC	GCT	TTT	TTG	GAT	ATT	AAT	CAT	CCG		723
Phe	Val	Glu	Pro	Gln	Gly	Ala	Ala	Phe	Leu	Asp	Ile	Asn	His	Pro		
				110				115					120			
GAA	AAC	ATT	CAA	TCG	ACT	CTG	AAA	AAT	GCT	GCT	AAT	GGC	CGC	GAT		768
Glu	Asn	Ile	Gln	Ser	Thr	Leu	Lys	Asn	Ala	Ala	Asn	Gly	Arg	Asp		
				125				130					135			
ATC	AAG	CTG	CTG	GTC	GTT	TCT	GAT	GCC	GAA	GGT	ATT	CTT	GGG	ATT		813
Ile	Lys	Leu	Leu	Val	Val	Ser	Asp	Ala	Glu	Gly	Ile	Leu	Gly	Ile		
				140				145					150			
GGA	GAC	TGG	GGT	GTC	CAG	GGT	GTT	GAT	ATT	GCT	GTC	GGC	AAA	CTG		858
Gly	Asp	Trp	Gly	Val	Gln	Gly	Val	Asp	Ile	Ala	Val	Gly	Lys	Leu		
				155				160					165			
ATG	GTT	TAT	ACA	GTT	GCG	GCC	GGA	ATC	GAT	CCA	TCA	ACA	GTT	CTT		903
MET	Val	Tyr	Thr	Val	Ala	Ala	Gly	Ile	Asp	Pro	Ser	Thr	Val	Leu		

FIGURE 2 - 2/4*Planche 3/8*

170	175	180	
GCA GTT GTT ATT GAT GCT GGA ACA AAT AAC GAA AAG CTT TTG AAA			948
Ala Val Val Ile Asp Ala Gly Thr Asn Asn Glu Lys Leu Leu Lys			
185	190	195	
GAT CCT ATG TAT TTG GGA AAT AAA TTT AAT CGT GTT CGT GGC GAT			993
Asp Pro MET Tyr Leu Gly Asn Lys Phe Asn Arg Val Arg Gly Asp			
200	205	210	
AAG TAC TAT GAT TTT ATC GAC AAA TTT GTT AAT CAT GCC GAA TCG			1038
Lys Tyr Tyr Asp Phe Ile Asp Lys Phe Val Asn His Ala Glu Ser			
215	220	225	
CTT TTT CCT AAT TTA TAT TTG CAT TGG GAA GAT TTT GGC CGT TCG			1083
Leu Phe Pro Asn Leu Tyr Leu His Trp Glu Asp Phe Gly Arg Ser			
230	235	240	
AAT GCT TCT AAT ATC TTA AAC AGC TAT AAA GAT AAA ATT GCT ACT			1128
Asn Ala Ser Asn Ile Leu Asn Ser Tyr Lys Asp Lys Ile Ala Thr			
245	250	255	
TTT AAT GAT GAT ATT CAA GGA ACT GGA ATC GTC GTT CTT GCC GGC			1173
Phe Asn Asp Asp Ile Gln Gly Thr Gly Ile Val Val Leu Ala Gly			
260	265	270	
GTT CTT GGA GCG TTG AAG ATT TCC GGT CAG AAA TTA ACT GAT CAA			1218
Val Leu Gly Ala Leu Lys Ile Ser Gly Gln Lys Leu Thr Asp Gln			
275	280	285	
ACT TAC ATG AGC TTC GGT GCC GGA ACT GCT GGA ATG GGA ATT GTT			1263
Thr Tyr MET Ser Phe Gly Ala Gly Thr Ala Gly MET Gly Ile Val			
290	295	300	
AAA CAG TTG CAT GAA GAA ATG GTT GAA CAG GGT CTT TCC GAC GAA			1308
Lys Gln Leu His Glu Glu MET Val Glu Gln Gly Leu Ser Asp Glu			
305	310	315	
GAG GCT AAA AAG CAT TTC TTC CTT GTT GAC AAA CAA GGC CTC TTG			1353
Glu Ala Lys Lys His Phe Phe Leu Val Asp Lys Gln Gly Leu Leu			
320	325	330	
TTT GAC GAT GAT CCG GAT TTA ACT CCA GAG CAA AAG CCT TTC GCT			1398
Phe Asp Asp Asp Pro Asp Leu Thr Pro Glu Gln Lys Pro Phe Ala			
335	340	345	
GCT AAA CGA AGT GAT TTC AAA AAT GCT AAT CAA TTG ACC AAT CTC			1443
Ala Lys Arg Ser Asp Phe Lys Asn Ala Asn Gln Leu Thr Asn Leu			
350	355	360	
CAA GCA GCT GTT GAA GCT GTC CAC CCG ACC ATT TTG GTC GGA ACC			1488
Gln Ala Ala Val Glu Ala Val His Pro Thr Ile Leu Val Gly Thr			
365	370	375	
TCG ACA CAT CCA AAT TCC TTT ACT GAA GAA ATT GTT AAA GAT ATG			1533
Ser Thr His Pro Asn Ser Phe Thr Glu Glu Ile Val Lys Asp MET			
380	385	390	
TCT GGT TAT ACT GAA AGA CCA ATC ATT TTT CCA ATT TCC AAT CCA			1578
Ser Gly Tyr Thr Glu Arg Pro Ile Ile Phe Pro Ile Ser Asn Pro			
395	400	405	
ACA AAA TTA GCC GAA GCA AAA GCC GAA GAT GTT TTG AAA TGG TCT			1623
Thr Lys Leu Ala Glu Ala Lys Ala Glu Asp Val Leu Lys Trp Ser			
410	415	420	

FIGURE 2 - 3/4

Planche 4/8

AAT GGA AAA GCC TTG ATC GGT ACT GGT GTT CCA GTT GAC GAT ATT	1668
Asn Gly Lys Ala Leu Ile Gly Thr Gly Val Pro Val Asp Asp Ile	
425 430 435	
GAA TAT GAG GGC AAC GCT TAC CAA ATC GGT CAG GCC AAC AAT GCC	1713
Glu Tyr Glu Gly Asn Ala Tyr Gln Ile Gly Gln Ala Asn Asn Ala	
440 445 450	
TTG ATC TAT CCA GGT CTT GGC TTT GGT GCC ATT GCC GCT CAA TCA	1758
Leu Ile Tyr Pro Gly Leu Gly Phe Gly Ala Ile Ala Ala Gln Ser	
455 460 465	
AAG CTG CTT ACG CCT GAA ATG ATT TCT GCT GCT GCC CAT AGT CTT	1803
Lys Leu Leu Thr Pro Glu MET Ile Ser Ala Ala Ala His Ser Leu	
470 475 480	
GGA GGA ATC GTT GAT ACA ACA AAA GTT GGT GCT GCT GTT TTG CCA	1848
Gly Gly Ile Val Asp Thr Thr Lys Val Gly Ala Ala Val Leu Pro	
485 490 495	
CCA GTT TCA AAA TTA GCC GAC TTT TCG CGT ACA GTC GCT GTC GCT	1893
Pro Val Ser Lys Leu Ala Asp Phe Ser Arg Thr Val Ala Val Ala	
500 505 510	
GTC GCT AAA AAA GCT GTT GAA CAA GGT CTT AAT CGC CAG CCG ATT	1938
Val Ala Lys Lys Ala Val Glu Gln Gly Leu Asn Arg Gln Pro Ile	
515 520 525	
GAT GAT GTT GAA AAG GCC GTC GAC GAT TTG AAG TGG GAT CCG AAA	1983
Asp Asp Val Glu Lys Ala Val Asp Asp Leu Lys Trp Asp Pro Lys	
530 535 540	
TAC TAA	1989
Tyr ---	
ATG AAT GCT TTT ATT ACG AGT GTT GAG AGT GTC GTA GAA ATT GTT	2033
MET Asn Ala Phe Ile Thr Ser Val Glu Ser Val Val Glu Ile Val	
1 5 10 15	
CTA GTG ATC GCT TTA GGT TAT GTT TTA AGG AGA TCG GGT AAA TTA	2078
Leu Val Ile Ala Leu Gly Tyr Val Leu Arg Arg Ser Gly Lys Leu	
20 25 30	
GCC GAC TCT TTT AAA GGG AAT ATC TCG TAT TTG ATT ATG AAT ATT	2123
Ala Asp Ser Phe Lys Gly Asn Ile Ser Tyr Leu Ile MET Asn Ile	
35 40 45	
GCC CTG CCG CTG TCG ATT TTT GTT AGC GTG CTG ACT TAT TTG ACC	2168
Ala Leu Pro Leu Ser Ile Phe Val Ser Val Leu Thr Tyr Leu Thr	
50 55 60	
CGC GAT AAA TTA GTT AGT CTG TCT GGC GGT TTG GTT TTC GCT GCG	2213
Arg Asp Lys Leu Val Ser Leu Ser Gly Gly Leu Val Phe Ala Ala	
65 70 75	
GCT AGT TTT GCT GTC AGC TAC GTG CTC GCT TAT TTG ATC ACA AAA	2258
Ala Ser Phe Ala Val Ser Tyr Val Leu Ala Tyr Leu Ile Thr Lys	
80 85 90	
ATT TTT AAA ATT CGG GTT GGT CGT CGT GGA ACA TTT ATC AAT ATG	2303
Ile Phe Lys Ile Arg Val Gly Arg Arg Gly Thr Phe Ile Asn MET	
95 100 105	
TTT GTT AAC GCT AAT ACG ATT TTT ATC GGT TTA CCG CTA AAT TCG	2348
Phe Val Asn Ala Asn Thr Ile Phe Ile Gly Leu Pro Leu Asn Ser	

FIGURE 2 - 4/4

Planche 5/8

110	115	120	
GCT TTG TTC GGT ACG AAG TCT ATG CCT TAT TTC TTA ATT TAT TAT			2393
Ala Leu Phe Gly Thr Lys Ser MET Pro Tyr Phe Leu Ile Tyr Tyr			
125	130	135	
GTT ATG AAT ACA ATC TCG ACG TGG GCA ATT GGC ATC TTC TTT ATT			2438
Val MET Asn Thr Ile Ser Thr Trp Ala Ile Gly Ile Phe Phe Ile			
140	145	150	
TCA TCC GAT GAT CCA ACG AGG GAT AAG ACG GAA AAA CAA AGT TTT			2483
Ser Ser Asp Asp Pro Thr Arg Asp Lys Thr Glu Lys Gln Ser Phe			
155	160	165	
AAT TGG AAA AAG TTA TTA CCA ATG CCA TTA GTT GGT TTC TTG ATT			2528
Asn Trp Lys Lys Leu Leu Pro MET Pro Leu Val Gly Phe Leu Ile			
170	175	180	
TCG ATT GTT GTT CTG CTT TTG GCA ATC CCG ATT CCC GGA TGG GTT			2573
Ser Ile Val Val Leu Leu Leu Ala Ile Pro Ile Pro Gly Trp Val			
185	190	195	
AGC ACG ACT TTT TCC ATG GTT GGC GGA ATT GTG ACG CCG ATG TCT			2618
Ser Thr Thr Phe Ser MET Val Gly Gly Ile Val Thr Pro MET Ser			
200	205	210	
CTG ATA TAT ATC GGA ATT ATT TTG GCT GAT GCT GGA TTG AAA TCG			2663
Leu Ile Tyr Ile Gly Ile Ile Leu Ala Asp Ala Gly Leu Lys Ser			
215	220	225	
ATT CAT TTC GAT CGC GAT TCG ATT TTA GCC TTA ATC GGC CGT TTC			2708
Ile His Phe Asp Arg Asp Ser Ile Leu Ala Leu Ile Gly Arg Phe			
230	235	240	
ATC ATT GTT CCG GCG GTT ATG ATT ATA ATT TTA AAA TTG TTT GGC			2753
Ile Ile Val Pro Ala Val MET Ile Ile Ile Leu Lys Leu Phe Gly			
245	250	255	
GGA TCA ATG CCA AAG CTT GAA TCT TCA ACG CTG ATT ATT CAA GCA			2798
Gly Ser MET Pro Lys Leu Glu Ser Ser Thr Leu Ile Ile Gln Ala			
260	265	270	
GCT GCT CCT GGA CTG GCT GTT TTG CCG ATC TTG GTT GGA CAA AAT			2843
Ala Ala Pro Gly Leu Ala Val Leu Pro Ile Leu Val Gly Gln Asn			
275	280	285	
CAT GGT GAC GTT GAA TAT GCA ACA AAT GTC GTT ACG ACT TCA ACG			2888
His Gly Asp Val Glu Tyr Ala Thr Asn Val Val Thr Thr Ser Thr			
290	295	300	
GTG CTC TTC GTG ATT GTT GTG CCG ATC TTG ATG CAG TTT GTC TAA			2933
Val Leu Phe Val Ile Val Val Pro Ile Leu MET Gln Phe Val ---			
310	315		
TGATAATTTA CGATTGAAAG ACTTACGCTC CGTAAGTCTT TTTTCTTGT ACAATTTTAA			2993
TCAGGTAG			3001

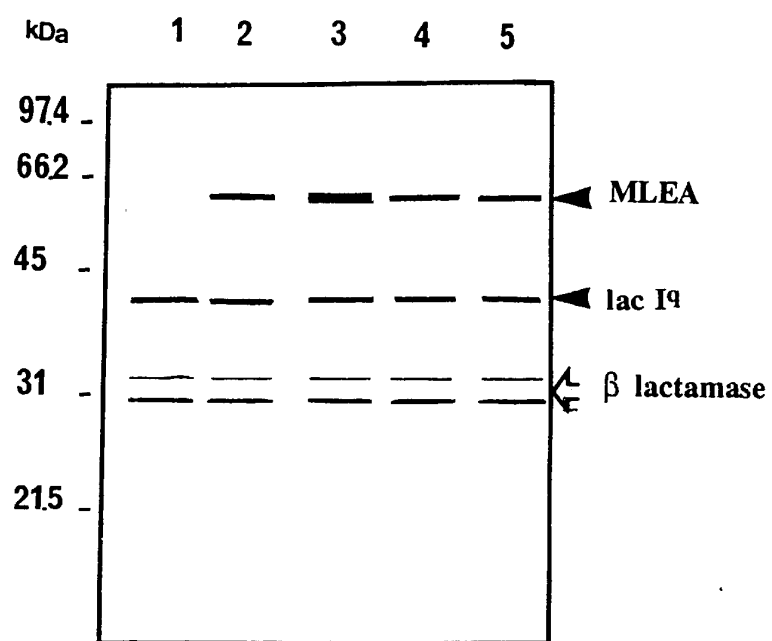
FIGURE 3

FIGURE 4

Planche 7/8

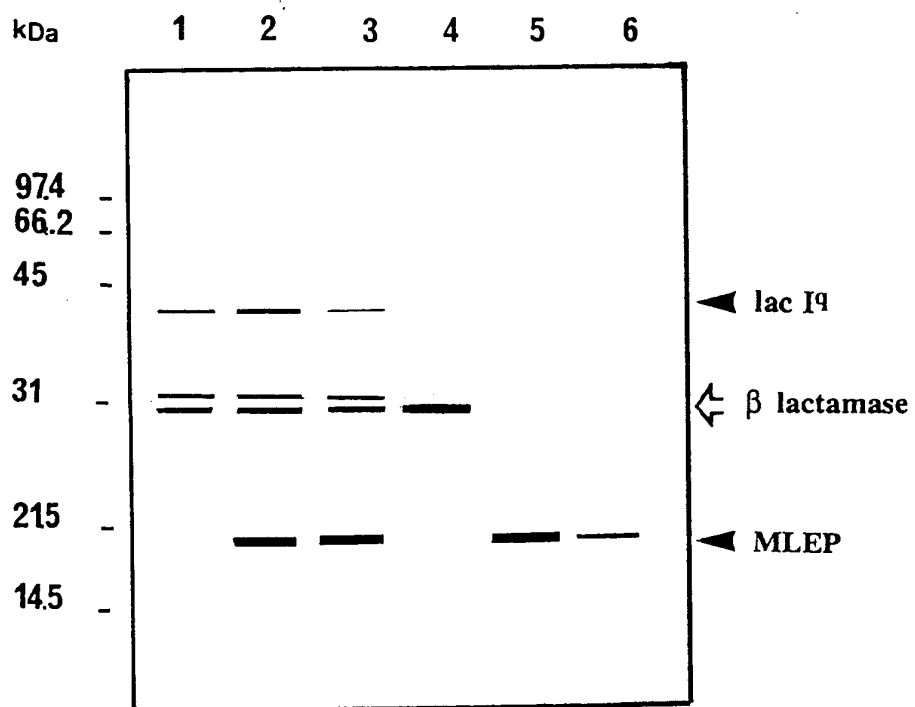
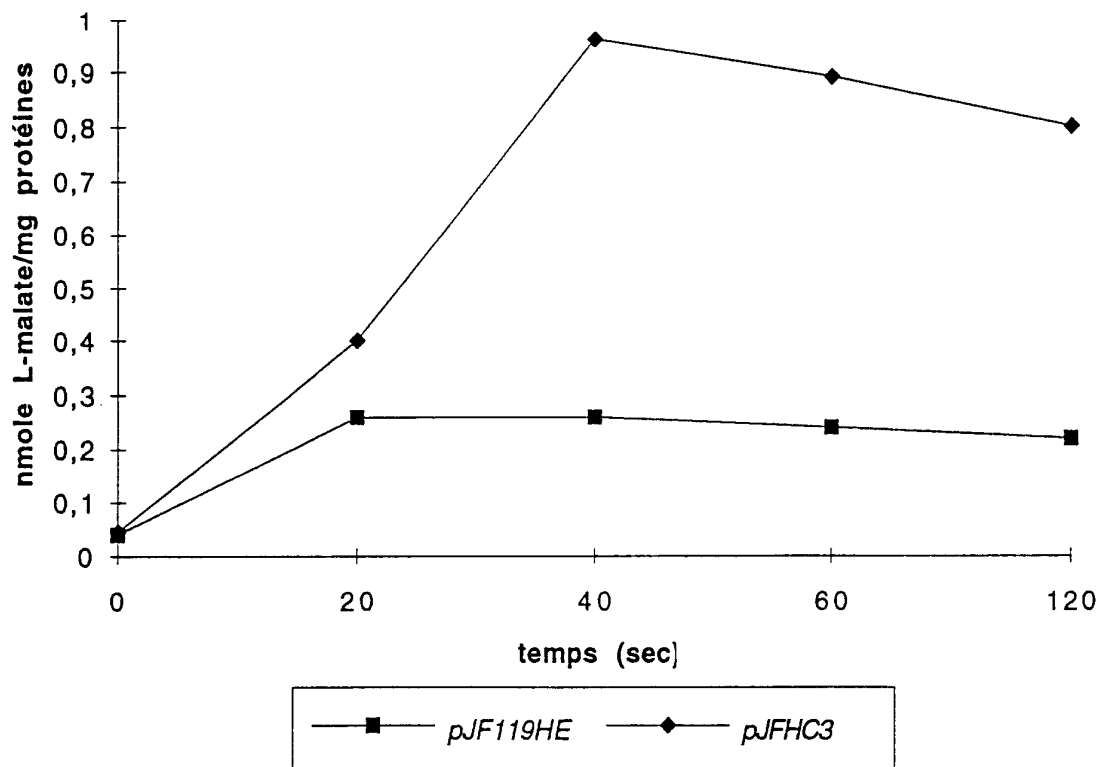


FIGURE 5

Feuille de calcul1 Graphique 1

Entrée du L-malate



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	FR-A-2 705 687 (INSTITUT D'OENOLOGIE) * page 7 * * page 9 - page 12 * * page 24, dernier alinéa - page 25 * * page 27 * * page 29 - page 36 *	1,3,4,7, 8,16-19
A	---	9,15
X	FEBS LETT., vol. 332, no. 1-2, Octobre 1993 pages 74-80, ANSANAY ET AL. 'Cloning, sequence and expression of the gene encoding the malolactic enzyme from Lactococcus lactis' * le document en entier *	1,3,4,7, 8,12,14, 16-19
A	---	3,5,10, 11
Y	J. BASIC MICROBIOLOGY, vol. 30, no. 8, Août 1990 pages 577-585, NAOURI ET AL. 'Purification and properties of a malolactic enzyme from Leuconostoc oenos ATCC 23278' * le document en entier *	1-5,7,8, 10-12, 16-19
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C12N C07K C12G
Y	DATABASE PASCAL INIST, CNRS (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE), VANDOEUVRE-LES-NANCY, FR AN: 95-0247112, * abrégé * & Thèse doctorale GALEOTE-ANSANAY V., Univ. Montpellier, FR. 1994-02, 163 p. INIST-T 96022; T94MON20045. ---	1-5,7,8, 10-12, 16-19

	-/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
25 Mars 1996		Gac, G
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche2736652
N° d'enregistrement
nationalFA 515714
FR 9508705

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	CHEM. MIKROBIOL. TECHNOL. LEBENSM., vol. 10, no. 1-2, 1986 pages 5-12, RADLER ET AL. 'Startenkulturen und neue Entwicklungen' * page 10 - page 11 * ---	7-12, 16-19
A	APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL., vol. 39, no. 3-4, 1993 pages 499-505, TOURDORT-MARECHAL ET AL. 'Transport of malic acid in Leuconostoc oenos strains defective in malolactic fermentation : a model to evaluate the kinetic parameters' * le document en entier * ---	10-13
A	EP-A-0 163 491 (BIOTECHNICA INTERNATIONAL) * page 3, ligne 28 - ligne 32 * * page 4, ligne 1 - ligne 5 * * page 5, ligne 13 - ligne 19 * * revendications 11,20 * -----	3-6,8,9, 16,17
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
25 Mars 1996		Gac, G
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 1503 03.92 (P04C13)