



① Número de publicación: **2 334 421**

② Número de solicitud: 200801612

⑤ Int. Cl.:

**C12N 1/16** (2006.01)

**C12N 15/81** (2006.01)

**C12G 1/022** (2006.01)

**C12R 1/865** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **29.05.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **09.03.2010**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**09.03.2010**

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**  
**c/ Serrano, 117**  
**28006 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **González García, Ramón y**  
**González Ramos, Daniel**

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Levaduras vínicas recombinantes.**

⑤ Resumen:

Levaduras vínicas recombinantes.

Método de obtención de cepas que secretan una mayor concentración de manoproteínas al medio, cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con el número CECT 13012, y usos de dichas cepas.

**ES 2 334 421 A1**

## DESCRIPCIÓN

Levaduras vínicas recombinantes.

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología molecular aplicada a la alimentación, de la ingeniería genética, y más específicamente en el campo de la enología. En concreto se refiere a levaduras vínicas recombinantes que estabilizan el vino frente a la quiebra proteica y secretan mayor cantidad de manoproteínas que las cepas no modificadas, así como su modo de obtención. Estas cepas permiten además mejorar la calidad del vino, gracias a su contribución al aumento en la concentración de manoproteínas, sin recurrir a la adición de preparados exógenos, permitiendo reducir el consumo de bentonita, con el consiguiente ahorro en producto, así como la reducción del impacto negativo de la bentonita en la complejidad sensorial del vino y en la recuperación volumétrica de vino tras el tratamiento.

## Estado de la técnica anterior

15 La industria del vino tiene una gran importancia económica y social, ya no exclusivamente en las regiones de clima mediterráneo, sino que el sector vitivinícola ha alcanzado importancia mundial. Por tanto, el control de los procesos que tienen lugar en la viticultura, es fundamental para el desarrollo y expansión de esta industria.

20 Uno de los problemas que suele afectar a los vinos blancos y rosados, en la fase de fermentación, es la quiebra proteica. Se conoce como quiebra proteica el enturbiamiento ocasional de los vinos blancos y rosados que se produce por una floculación (reposo) de las proteínas naturales de la uva, debido a las altas temperaturas o el tiempo de almacenamiento. Esta turbidez puede ser apreciada por los consumidores como una alteración (Waters, E., Dupin, I. and Stockdale, V. 2000. A review of current knowledge on polysaccharides that protect against protein haze in white wine. Aust. Grapegrower Winemaker, 438a: 13-16).

Actualmente, el único sistema realmente eficaz para evitar la quiebra proteica es la eliminación de las proteínas inestables, lo que únicamente se puede conseguir con el tratamiento con bentonita o mediante ultrafiltración.

30 No obstante, la clarificación con bentonita es un proceso que afecta la calidad sensorial del vino. Al eliminar gran parte de las proteínas, el vino pierde estructura y untuosidad. Además la bentonita afecta seriamente el aroma del vino, ya que absorbe directamente aromas, o indirectamente ya que las proteínas son fijadores de aromas y al ser eliminadas del vino arrastran con ellas parte de estos aromas. Además, las proteínas son moléculas tensoactivas y se ha comprobado que son factores muy positivos para la espumabilidad y la persistencia de la espuma de los vinos espumosos. La alternativa de la ultrafiltración también afecta significativamente el aroma y la untuosidad del vino, además de que su implantación requiere llevar a cabo una inversión cuantiosa por parte de las bodegas.

40 El origen de las proteínas del vino es múltiple, ya que pueden proceder de la misma uva, de las levaduras por autólisis y de los productos de clarificación o de los coadyuvantes de tiraje de naturaleza proteica. Por ello, la fracción proteica de un vino estará condicionada entre otros por aspectos tales como la variedad vinífera, el grado de madurez, el sistema de vinificación, la cepa de levadura, el tiempo de contacto con las lías, la dosis y el tipo de clarificante empleado, y en el caso de los vinos espumosos, por el tiempo de crianza y por el tipo y la dosis del coadyuvante de tiraje empleado.

45 Las proteínas fundamentalmente implicadas en la quiebra proteica son las procedentes de la uva, mientras que parece que las manoproteínas liberadas por las levaduras en la vinificación ejercen un efecto estabilizador frente a la misma, ya que actúan como coloides protectores e incrementan la estabilidad del vino. Por tanto, la cepa de levadura, que es uno de los factores que controlan la cantidad de manoproteínas liberadas durante la producción enológica, es un factor determinante de la quiebra proteica. Además las levaduras liberan constituyentes celulares, como proteínas o polisacáridos, que también contribuyen a la calidad del vino (Feuillat, M. 2003. Yeast macromolecules: Origin, Composition and Enological interest. *Am J. Enol. Vitic.* 54: 211-213). Otras propiedades enológicas de las manoproteínas son la protección frente a la inestabilidad tartárica, la retención de compuestos del aroma, la reducción de la astringencia, aumento de la sensación dulce, y aumento del cuerpo y redondez en boca, especialmente apreciados en vino tinto. Además, las manoproteínas estimulan el crecimiento de bacterias lácticas, y consecuentemente la fermentación maloláctica, y mejoran la calidad de la espuma de vinos espumosos.

55 Algunas proteínas concretas de la pared celular de la levadura se ha demostrado específicamente que son capaces de estabilizar el vino frente a quiebra proteica (Waters, E.J., Wallace, W., Tate, M.E. and Williams, P.J. 1993. Isolation and partial characterization of a natural haze protective factor from wine. *J. Agric. Food Chem.* 41:724-730; Waters, E.J., Pellerin, P. and Brillouet, J.M. 1994. A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze. *Carbohydr. Polym.* 23:185-191.). Brown y colaboradores (Brown *et al.* 2007. Reducing haziness in white wine by overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* genes YOL155c and YDR055w. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73:1363-1376) clonaron y sobreexpresaron en cepas de laboratorio de *S. cerevisiae* los genes YOL155c and YDR055w, que codifican respectivamente las proteínas Hpf1p y Hpf2p, y demostraron que la proteína Hpf2 así producida reducía la turbidez hasta un 40% cuando se añadía al vino. Sin embargo no existe ninguna cepa vínica recombinante que secrete más manoproteínas durante la fermentación alcohólica.

La estrategia general en ingeniería genética para sobreexpresar una determinada proteína es clonar el gen, o los genes, que codifican dicha proteína en el organismo de interés. Dicho gen o proteína de interés, comprendido en una secuencia polinucleotídica, es introducido en el organismo hospedador, generalmente mediante un sistema o vector de expresión génica, operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), etc... Existen numerosos ejemplos, como la solicitud de patente WO/2003/04037, o la patente estadounidense US 6,274,311.

En resultados previos con cepas de laboratorio, se ha demostrado que, no la inserción, sino la delección de los genes *FKSI*, *GPI7*, *GASI* ó *KNR4* (aunque en este contexto no es muy importante sería más correcto poner en itálica los nombres de los genes, pero no de las proteínas, a lo largo de todo el texto, los he señalado en azul), daba lugar a un incremento en la liberación de manoproteínas en medios de cultivo (González-Ramos, D. and González, R. 2006. Genetic determinants of the release of mannoproteins of enological interest by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.* 54:9411-9416). Este fenotipo es recesivo y depende del fondo genético. El sobrenadante de las cepas que carecen de todas las copias de los genes correspondientes es más rico en manoproteínas que el de las cepas control, ya desde el inicio de la fase estacionaria. Cuando se añaden exógenamente a un vino, los polisacáridos aislados de estos sobrenadantes permiten mejorar la estabilidad proteica de los vinos acabados, de acuerdo con el contenido relativo en manoproteínas de cada uno.

### Descripción de la invención

Existe la necesidad de obtener vinos de elevada estabilidad frente a la quiebra proteica y que conserve las cualidades organolépticas óptimas, no mermando la calidad de los mismos mediante la adición en elevadas cantidades de otros componentes, como la bentonita. Las manoproteínas liberadas por las levaduras en la vinificación actúan como coloides protectores e incrementan la estabilidad del vino, ejerciendo un efecto estabilizador frente a la quiebra proteica, además de mejorar algunas cualidades organolépticas del vino resultante.

A pesar de los resultados previos obtenidos en cepas de laboratorio, la mejora genética de cepas industriales implica la superación de dos problemas técnicos:

1- El efecto impredecible del fondo genético de las cepas industriales sobre el fenotipo de los mutantes, ya que los estudios de laboratorio habían revelado una importante influencia del fondo genético.

2- En cepas de laboratorio, el incremento en la secreción de manoproteínas siempre ha estado aparejado a problemas de crecimiento, de modo que cabría esperar dificultades para la fermentación del mosto de uva, al realizar la modificación de cepas industriales.

Los autores de la presente invención, mediante ingeniería genética, han desarrollado un método que permite obtener cepas que incrementan la secreción de manoproteínas. Además, han obtenido una cepa, que tiene delecionado el gen *KNR4*, y que incrementa la secreción de dichas manoproteínas sin disminuir la tasa de crecimiento, manteniendo los niveles de fermentación adecuados. Estas manoproteínas de la pared celular aportan características beneficiosas al vino resultante, como estabilidad proteica y tartárica, estabilidad en el aroma y color, o astringencia.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para obtener cepas de levadura recombinantes industriales (de aquí en adelante método de la invención), que aumentan la concentración de manoproteínas secretadas al medio, y que comprende delecionar en un fondo genético de cepas de *levadura* industriales genes relacionados con la biogénesis de la pared celular o la liberación de proteínas. Preferiblemente, las cepas pertenecen al género *Saccharomyces*, y más preferiblemente, a la especie *S. cerevisiae*. Entre los genes delecionados, preferiblemente se encuentran *GPI7*, *FKSI* y *GASI*, y aún más preferiblemente el gen *KNR4*.

El término "levadura" en esta memoria, se aplica a diversos hongos ascomicetos unicelulares que se reproducen por gemación o división, y llevan a cabo la fermentación alcohólica de los hidratos de carbono. Así, se encuentran incluidos dentro de este término todos los organismos que pueden ser clasificados dentro del Orden *Saccharomycetales*, y especialmente todas las especies que se encuentran dentro del género *Saccharomyces*. También incluye las especies de *Hanseniaspora* (principalmente *H. uvarum*).

Por "fondo genético" se entiende la información genética total que poseen los miembros reproductores de una población de organismos o especie, o cepa en cierto momento.

*GPI7* (YJL062w) es un gen que codifica una enzima involucrada en las síntesis del anclaje GPI. El GPI es una estructura que interviene en la unión de algunas proteínas a la membrana plasmática o a la pared celular.

*GASI* (YMR307w) codifica para una glicoproteína de la membrana plasmática. *GASIp* posee actividad  $\beta$ -1,3-glucanosiltransferasa y está involucrada en la elongación de las ramificaciones  $\beta$ -1,3-glucano.

*FKSI* (YLR342w) codifica para una subunidad de la  $\beta$ -1,3-glucanosintasa.

## ES 2 334 421 A1

*KNR4* (YGR229c) codifica una proteína reguladora y está también involucrado en la síntesis de  $\beta$ -1,3-glucano.

5 Generalmente, los métodos de delección implican varios pasos de clonación, y comprenden la construcción de un cassette de delección que contiene un cassette de expresión para un gen marcador flanqueado con secuencias de pares de bases correspondientes al promotor y terminador del gen a deleccionar. Posteriormente, los casetes de delección se amplifican por PCR y se utilizan para transformar las cepas de levaduras industriales seleccionadas. A continuación, los transformantes se seleccionan en función de dicho gen marcador. En el caso de los genes *KNR4*, *GPI7*, *FKS1* y *GAS1* el fenotipo de mayor liberación de manoproteínas ligado a los mismos es recesivo, por lo que es necesario deleccionar todas las copias de los mismos en los dos fondos genéticos que se seleccionen, utilizando diversos cassettes de delección con diferentes genes marcadores.

15 Un “cassette” o “casete” es una región codificante de un gen procedente de un organismo procarionta o eucariota flanqueada por los elementos reguladores necesarios para su expresión *in vivo* o *in vitro*. Aunque los casetes de expresión pueden tener configuraciones muy variadas, deben contener por lo menos un promotor (*promoter*), una región codificante (ADNc eucariota o gen procarionta) y un terminador de la transcripción (*terminator*) o un sitio de poliadenilación, según se trate de un gen derivado de un organismo procarionta o de un ADNc procedente de un organismo eucariota. A esta configuración básica se le añade, si fuera necesario, una secuencia con función reguladora para la expresión natural del gen en el sistema elegido, p. ej.: un operador, un potenciador, la secuencia de Shine y Dalgarno para la unión al ARNr de *E. coli*, o las secuencias de un péptido señal (si la proteína se exporta).

20 Otro aspecto de la invención lo constituyen las cepas obtenidas por el método de la invención. Dichas cepas tendrían un fondo genético en el que estarían deleccionados genes relacionados con una mayor secreción de manoproteínas al medio. Preferiblemente, las cepas tendrían deleccionados todas las copias presentes en el genoma de los genes *KNR4*, *GPI7*, *FKS1*, *GAS1*, o cualquiera de sus combinaciones. Más preferiblemente las cepas tendrían deleccionado el gen *KNR4*.

30 En otro aspecto de la invención se proporciona una cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, depositada el 14 de mayo de 2008 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con el número CECT 13012.

Los organismos de la especie *Saccharomyces cerevisiae* pertenecen al Superreino *Eukaryota*, (grupo *Metazoa/Fungi*), Reino *Fungi*, Subreino *Dikarya*, Phylum *Ascomycota*, Subphylum *Saccharomycotina*, Clase *Saccharomycetes*, Orden *Saccharomycetales*, Familia *Saccharomycetaceae* y Género *Saccharomyces*.

35 La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de la invención (CECT 13012), que se ha obtenido mediante el método de la invención, es capaz de secretar una gran cantidad de manoproteínas en todas las condiciones de cultivo ensayadas. Dichas manoproteínas estabilizan el vino resultante frente a la quiebra proteica, por lo que la cantidad de bentonita que es necesario añadir a estos vinos es hasta un 25% menor, con lo que se incrementan las cualidades sensoriales y organolépticas del vino resultante.

40 Otro aspecto se refiere al uso de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de la invención para la fermentación alcohólica. Más preferiblemente, la cepa de la invención se usa para la vinificación de vinos blancos y rosados, así como vinos tintos o vinos espumosos.

45 La fermentación alcohólica es un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire (oxígeno), originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono (por regla general azúcares: como pueden ser por ejemplo la glucosa, la fructosa, la sacarosa, el almidón, etc.) para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol, dióxido de carbono en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico. Esta producción de etanol es característica de la elaboración de algunas bebidas alcohólicas, tales como el vino, la cerveza, la sidra, el cava, etc.

50 Por “vinificación” se entiende la fermentación del mosto de la uva, y la consecuente transformación del zumo de ésta en vino.

55 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### 60 Breve descripción de las figuras

Figura 1 (Fig. 1). Concentración de polisacáridos liberados en medio GCY por cepas deleccionadas en los genes *KNR4*, *FKS1*, *GPI7* o *GAS1*. A- Cepas deleccionadas en *KNR4*. B- Cepas deleccionadas en *GPI7*. C- Cepas deleccionadas en *FKS1*. D- Cepas deleccionadas en *GAS1*.

Figura 2 (Fig. 2). Cinética de producción de CO<sub>2</sub> por cepas salvajes (T73-4 y EC1118) or recombinantes (EKD-13 y TKD-123) en mostos Sauvignon Blanc de las cosechas 2006 y 2007. A- Cosecha 2006, cepas T73-4 y TKD-

123. B- Cosecha 2007, cepas T73-4 y TKD-123. C- Cosecha 2006, cepas EC1118 y EKD-13. D- Cosecha 2007, cepas EC1118 y EKD-13.

Figura 3 (Fig. 3). Comparación de las manoproteínas presentes en vinos Sauvignon Blanc fermentados con EC1118 y EKD-13. A: vino del 2007; B: vino del 2006; 1: EC1118; 2: EKD-13.

Figura 4 (Fig. 4). Turbidez inducida de vinos Sauvignon blanc fermentados con las diferentes cepas salvajes o recombinantes obtenidos sobre mostos de las cosechas 2006 y 2007. A- Cosecha 2006, cepas T73-4, TKD-123 y TGD-13. B- Cosecha 2006, cepas EC1118, EKD-13 y EFD-31. C- Cosecha 2007, cepas T73-4, TKD-123, TGD-13 y TGASD-31. D- Cosecha 2007, cepas EC1118, EKD-13, EGD-13 y EFD-31.

Figura 5 (Fig. 5). Estabilización por bentonita de vinos Sauvignon Blanc obtenidos con EC1118 y las cepas recombinantes EKD-13, EGD-13 y EFD-13.

Figura 6 (Fig. 6): Manoproteínas que quedan tras cada tratamiento con bentonita de los vinos obtenidos con EC1118 o EKD-13.

### Exposición detallada de modos de realización

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la utilidad del método desarrollado, y de la cepa de la invención, para disminuir la quiebra proteica en los vinos obtenidos utilizando las cepas recombinantes. Se ensayó la delección de los genes *KNR4*, *GPI7*, *FKS1* y *GAS1* en dos fondos genéticos industriales de *Saccharomyces cerevisiae* (EC1118 y T73-4).

#### Preparación de construcciones para la delección

El fenotipo de mayor liberación de manoproteínas ligado a la delección de los genes *KNR4*, *GPI7*, *FKS1* y *GAS1* es recesivo, de modo que fue necesario deleccionar todas las copias de los mismos en los dos fondos genéticos seleccionados. Cada copia se deleccionó usando un marcador de selección diferente, se utilizaron *ARO4-OFP* y *KanMX4*, y en el caso de una de las cepas, se utilizó también *URA3* debido a la presencia de una tercera copia del gen *KNR4*.

Los *cassettes* de delección se construyeron flanqueando el gen marcador con secuencias de alrededor de 500 pares de bases correspondientes al promotor y terminador del gen a deleccionar.

En primer lugar se clonó el marcador *ARO4-OFP* en el plásmido bacteriano pUC19. *ARO4-OFP* se aisló del plásmido pEA2 (Cebollero, E. and González, R. 2004. Comparison of two alternative dominant selectable marker for wine yeast transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:7018-7023) mediante su digestión con las enzimas de restricción *SacI* y *BamHI* y se insertó por ligación en pUC19 digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante se denominó pUCARO.

Los *cassettes* de delección de los diferentes genes se construyeron como se describe a continuación.

- *KNR4*: La región promotora y terminadora de *KNR4* se amplificaron por PCR con los pares de cebadores PKARO-f/PKARO-r y TKARO-f/TKARO-r respectivamente (tabla 1). Estos dos insertos se donaron secuencialmente en pUCARO mediante la técnica de "primer extension" (Geiser, M., R. Cebe, D. Drewello, and R. Schmitz. 2001. Integration of PCR fragments at any specific site within cloning vectors without the use of restriction enzymes and DNA ligase. *BioTechniques* 31:88-92) y el plásmido resultante se denominó pDKNR4-1. El gen marcador *URA3* se amplificó por PCR con el par de cebadores RURA-f/RURA-r (tabla 1) usando DNA genómico de la cepa EC1118 como molde y se donó en pDKNR4-1 por la técnica de "primer extensión" reemplazando el gen *ARO4-OFP*. El plásmido resultante se denominó pDKNR4-2. Finalmente el gen marcador *KanMX4* se amplificó por PCR con el par de cebadores RKAN3-f/RKAN-r (tabla 1) usando el plásmido pITGPCR3 como molde (Tabera, L., Muñoz, R. and Gonzalez, R. 2006. Deletion of *BCY1* from the *Saccharomyces cerevisiae* genome is semidominant and induces autolytic phenotypes suitable for improvement of sparkling wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:2351-2358) y se clonó sobre pDKNR4-1 de igual manera que *URA3*, reemplazando el gen marcador. El plásmido resultante se denominó pDKNR4-3.
- *GPI7*: La región promotora y terminadora de *GPI7* se amplificaron por PCR con los pares de cebadores PGARO-f/PGARO-r y TGARO-f/TGARO-r respectivamente (tabla 1). Se donaron secuencialmente en pUCARO para dar lugar al plásmido pDGPI7-1.
- *FKS1*: La región promotora y terminadora de *FKS1* se amplificaron por PCR con los pares de cebadores PFKS-f/PFKS-r y TFKS-f/TFKS-r respectivamente (tabla 1). Se donaron secuencialmente en pUCARO para dar lugar al plásmido pDFKS1-1.
- *GAS1*: La región promotora y terminadora de *GAS1* se amplificaron por PCR con los pares de cebadores PGAS-f/PGAS-r y TGAS-f/TGAS-r respectivamente (tabla 1). Se donaron secuencialmente en pUCARO para dar lugar al plásmido pDGAS1-1.

## ES 2 334 421 A1

### Transformación de cepas industriales de levadura

Los diferentes cassettes de delección se amplificaron por PCR tal y como se describe en la tabla 2.

5 Para la delección de los genes *GPI7*, *FKS1* y *GAS1* con el marcador de selección *KanMX4*, no se construyó un cassette de delección. En su lugar, se utilizó como molde el DNA genómico de cepas ya delecionadas en esos genes usando el marcador *KanMX4*, y procedentes de la colección de cepas de delección Euroscarf (tabla 2).

10 Para la construcción de cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* delecionadas en los genes ya mencionados, se utilizaron dos cepas diferentes: EC1118 y T73-4 (auxótrofa para uridina). La transformación de las cepas con los cassettes de delección se llevó a cabo mediante el método de acetato de litio descrito por (Ito, H., Fukada, Y., Murata, K. and Kimura, A. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacteriol. 153:163-168), y modificado por (Agatep, R., Kirkpatrick, R.D., Parchaliuk, D.L., Woods, R.A. and Gietz, R.D. 1998. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol (LiAc/ss-DNA/PEG) protocol. Technical Tips Online 1:51:P01525 (<http://tto.trends.com>)). Brevemente, las cepas de levadura fueron transformadas con 20  $\mu$ l de la reacción de amplificación por PCR del *cassette* de delección correspondiente.

15 Para los *cassettes* con el marcador de selección *ARO4-OPF*, tras la transformación, las células se diluyeron 10 veces en YPD y se incubaron durante 17 horas a 30°C y 200 rpm para permitir la expresión de la resistencia antes de aplicar la presión selectiva. Los transformantes se seleccionaron tras 5 días de incubación a 30°C en placas de SD conteniendo 2 g/l de PFP (glucosa 20 g/l, Yeast Nitrogen Base 6.7 g/l, Agar 20 g/l, Fenilalanina 0.9 g/l, Parafluorofenilalanina 2 g/l).

20 Para los *cassettes* con el marcador de selección *KanMX4*, las células se diluyeron 2 veces en YPD y se incubaron a 30°C y 200 rpm para permitir la expresión del alelo de resistencia. Los transformantes se seleccionaron tras dos días de incubación a 30°C en placas de YPD con 40  $\mu$ g/ml de G418 (glucosa 20 g/l, peptona 20 g/l, extracto de levadura 10 g/l, agar 20 g/l).

25 Finalmente, para el marcador URA3 los transformantes se seleccionaron tras dos días de incubación a 30°C en placas de SD sin uridina.

Los fenotipos de los transformantes se confirmaron por réplica en placa sobre los mismos medios de selección utilizados para la transformación.

### 35 *Análisis de los transformantes*

Los diferentes transformantes se crecieron en YPD líquido a 30°C y 200 rpm. Se extrajo su DNA genómico siguiendo el método descrito por Querol *et al.* (Querol, A., Barrio, E. and Ramon, D. 1992. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15:439-446).

40 • *KNR4*: La integración del cassette DKNR4-1 se analizó por PCR en tiempo real ABI Prism 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems). Los cebadores usados para ello fueron PromARO4Q y TermKNR4Q (tabla 3). La correcta inserción del cassette fue adicionalmente confirmada por la amplificación por PCR de todo el locus usando los cebadores CDKNR-f y CDKNR-r (tabla 3), y verificación del tamaño del amplificación por electroforesis en gel de agarosa. La inserción del resto de marcadores de selección fue analizada directamente de esta última forma.

45 • *GPI7*: En todos los casos, el locus *GPI7* se amplificó con los cebadores CDGPI-f y CDGPI-r (tabla 3), y los tamaños de los amplicones fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa.

50 • *FKS1*: El locus *FKS1* se amplificó con los cebadores CDFKS-f y CDFKS-r (tabla 3), y los tamaños de los amplicones fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa.

55 • *GAS1*: El locus *CAS1* se amplificó con los cebadores CDGAS-f y CDGAS-r (tabla 3), y los tamaños de los amplicones fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa.

60 Las cepas construidas se muestran en la tabla 4.

65

# ES 2 334 421 A1

TABLA 1

*Cebadores empleados en la construcción de los cassettes de delección*

	<b>Cebador</b>	<b>Secuencia (5', 3')</b>
5	TKARO-f	SEQ ID NO: 1
	TKARO-r	SEQ ID NO: 2
10	PKARO-f	SEQ ID NO: 3
	PKARO-r	SEQ ID NO: 4
15	RURA3-f	SEQ ID NO: 5
	RURA3-r	SEQ ID NO: 6
	RKAN3-f	SEQ ID NO: 7
	RKAN3-r	SEQ ID NO: 8
20	TGARO-f	SEQ ID NO: 9
	TGARO-r	SEQ ID NO: 10
25	PGARO-f	SEQ ID NO: 11
	PGARO-r	SEQ ID NO: 12
	PFKS-f	SEQ ID NO: 13
	PFKS-r	SEQ ID NO: 14
30	TFKS-f	SEQ ID NO: 15
	TFKS-r	SEQ ID NO: 16
35	PGAS-f	SEQ ID NO: 17
	PGAS-r	SEQ ID NO: 18
	TGAS-f	SEQ ID NO: 19
40	TGAS-r	SEQ ID NO: 20

45

50

55

60

65

ES 2 334 421 A1

TABLA 2

*Amplificación por PCR de los cassettes de delección*

<b>Cassette de delección</b>	<b>DNA molde</b>	<b>Marcador de selección</b>	<b>Pareja de cebadores</b>	<b>Gen a deleccionar</b>
DKNR4-1	pDKNR4-1	ARO4-OFP	TKARO-f/ PKARO-r	KNR4
DNKR4-2	pDKNR4-2	URA3		
DKNR4-3	pDKNR4-3	KanMX4		
DGPI7-1	pDGPI7-1	ARO4-OFP	TGARO-f/ PGARO-r	GPI7
DGPI7-3	gDNA Y01361	KanMX4		
DFKS1-1	pDFKS1-1	ARO4-OFP	PFKS-f/ TFKS-r	FKS1
DFKS1-3	gDNA Y05205	KanMX4		
DGAS1-1	pDGAS1-1	ARO4-OFP	PGAS-f/ TGAS-r	GAS1
DGAS1-3	gDNA Y00897	KanMX4		

TABLA 3

*Cebadores empleados en el análisis de los transformantes*

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia (5', 3')</b>
PromARO4Q	SEQ ID NO: 21
TermKNR4	SEQ ID NO: 22
CDKNR-f	SEQ ID NO: 23
CDKNR-r	SEQ ID NO: 24
CDGPI-f	SEQ ID NO: 25
CDGPI-r	SEQ ID NO: 26
CDFKS-f	SEQ ID NO: 27
CDFKS-r	SEQ ID NO: 28
CDGAS-f	SEQ ID NO: 29
CDGAS-r	SEQ ID NO: 30



ES 2 334 421 A1

TABLA 4

Resumen de las cepas construidas

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Cepa	Fondo genético	Gen delecionado	Copias delecionadas	Marcadores utilizados
EKD/2-1	EC1118	KNR4	1	ARO4-OFP
EKD-13			2 (todas)	ARO4-OFP, KanMX4
EGD/2-1		GPI7	1	ARO4-OFP
EGD-13			2 (todas)	ARO4-OFP, KanMX4
EFD/2-3		FKS1	1	KanMX4
EFD-31			2 (todas)	KanMX4, ARO4-OFP
EGASD/2-3		GAS1	1	KanMX4
TKD/2-1		T73-4	KNR4	1
TKD-13'	2			ARO4-OFP, KanMX4
TKD-123	3 (todas)			ARO4-OFP, KanMX4, URA3
TGD/2-1	GPI7		1	ARO4-OFP
TGD-13			2 (todas)	ARO4-OFP, KanMX4
TFD/2-3	FKS1		1	KanMX4
TFD-31'			2	KanMX4, ARO4-OFP
TGAS/2-3	GAS1		1	KanMX4
TGAS-31		2 (todas)	KanMX4, ARO4-OFP	

Ejemplos

60 Liberación de manoproteínas por las cepas delecionadas y utilizando medios de laboratorio (GCY)

Se inoculó medio GCY con cada cepa, a una DO600 de 0,1 a partir de un precultivo en el mismo medio, y se hizo un seguimiento de la curva de crecimiento a 30°C y 150 rpm, hasta fase estacionaria. Los ensayos se llevaron a cabo con las cepas parentales, EC1118 y T73-4, y las diferentes cepas derivadas de las mismas, que aparecen en la tabla 4. Las deleción daba lugar a un crecimiento más lento en algunas de las cepas, sobre todo en las que llevaban todas las copias del gen correspondiente delecionadas. También se observaba cierto efecto de la modificación genética sobre la OD en fase estacionaria.

65

## ES 2 334 421 A1

Se midió la cantidad de polisacáridos liberada durante el crecimiento en medio GCY (2% glucose, 2% Bacto Casaminoacids, 0.67% Difco Yeast Nitrogen Base). Para ello se recuperó el sobrenadante por centrifugación y se separaron las macromoléculas presentes en el mismo mediante exclusión molecular en columnas Econo-Pac (Bio-Rad). La concentración de manoproteínas y polisacáridos en la fracción eluida se determinó frente a una curva de calibrado de manano comercial mediante el método de fenol sulfúrico (Segarra, I., Lao, C., López-Tamames, E. and de la Torre-Boronat, M.C. 1995. Spectrophotometric methods for the analysis of polysaccharide levels in winemaking products. *Am J. Enl. Vitic.* 46:564-570). Se realizaron cinco replicas de cada determinación y se compararon mediante ANOVA los resultados de las diferentes cepas.

También se llevó a cabo la detección de las manoproteínas mediante el método de la Concanavalina A conjugada con peroxidasa. Para ello se cargaron 10  $\mu$ l del sobrenadante de cada cultivo en geles de SDS-PAGE (Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685). El material se transfirió a membranas de nitrocelulosa usando el sistema Mini Protean de Bio-Rad. La detección se llevó a cabo mediante el método descrito por Klis *et al.* (Klis, F.M., Ram, A.F.J., Montijn, R C., Kapteyn, J.C., Caro, L.H.P., Vossen, J.H., Van Berkel, M.A.A., Brekelmans, S.S.C. and Van den Ende, H. 1998. Posttranslational modifications of secretory proteins. p 223-238. In *Methods in Microbiology*, Academic Press: New York).

Algunos de los resultados obtenidos se muestran en la figura 1. Se observa dependencia del fondo genético y del gen concreto que se ha modificado. El mayor efecto se observó siempre en el caso de las cepas delecionadas en todas las copias del gen correspondiente, especialmente para *KNR4* y *GPI7*. A raíz de estos resultados se decidió completar la caracterización fundamentalmente con las cepas delecionadas en todas las copias de cada gen.

### *Poder fermentativo de las cepas delecionadas*

Se llevaron a cabo ensayos de fermentación utilizando diferentes lotes de mosto Sauvignon Blanc natural. El contenido en azúcar del mosto de la cosecha 2006 fue alto (32% p/v), mientras que el de la cosecha 2007 fue normal (25% p/v). Estos ensayos se llevaron a cabo sólo con las cepas parentales y los derivados con todas las copias del gen correspondiente eliminadas. En la figura 2 se muestran algunos perfiles de fermentación según la liberación de CO<sub>2</sub>, representativos de la cepa más interesantes. Las determinaciones de azúcar residual y etanol producido se llevaron a cabo mediante HPLC. Para ello se utilizó un cromatógrafo Thermo (Thermo Electron Corporation), equipado con una bomba SpectraSystem P400, detector SpectraSystem RI150, e inyector AS3000. Se utilizó una columna de Bio-Rad HPX-87H en las siguientes condiciones de elución: fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5 mM, flujo 0.6 ml/min, temperatura del horno 50°C. Las muestras se diluyeron entre 2 y diez veces y se filtraron por un filtro de PVDF de 0.45  $\mu$ m. En conjunto se aprecia que el fondo T73-4 es poco apropiado en el caso de la deleción de *KNR4*, ya que da lugar a problemas de fermentación, sobre todo con el mosto de 2006. Con el fondo EC11118 también se observa un ligero efecto negativo con el mosto de 2006, que parece el más problemático, pero este efecto parece compatible con la aplicación industrial de la cepa.

### *Liberación de manoproteínas en mostos naturales*

En la figura 3 se muestran los resultados del análisis mediante el método de la Concanavalina A conjugada con peroxidasa, de los sobrenadantes de cultivo obtenidos al final de la fermentación, de las fermentaciones de mostos naturales descritas más arriba. Se observa mayor liberación en el caso de la cepa EKD-13.

### *Estabilización frente a quiebra proteica de vinos sin tratar obtenidos a partir de mostos naturales*

La estabilidad proteica de los vinos obtenidos de la fermentación de mostos naturales se examinó mediante incubación de alícuotas de 5 ml a 85°C durante 30 minutos y enfriamiento en hielo. Posteriormente se midió la turbidez en un nefelómetro (Hach). Se analizaron los datos de 9 réplicas mediante ANOVA. En la figura 4 se muestran los valores de turbidez de los vinos de las diferentes cepas tras el tratamiento. Destaca la reducción de turbidez en la cepa EKD-13 y la falta de reducción en TKD-123.

### *Reducción de la demanda de bentonita para la estabilización de vinos obtenidos a partir de mostos naturales*

Se llevaron a cabo fermentaciones de mostos naturales y se trataron diversas alícuotas con cantidades crecientes de bentonita, analizándose posteriormente la estabilidad de los vinos obtenidos, en función del tratamiento con bentonita, mediante el método descrito en el apartado anterior. Se determinó la cantidad de bentonita mínima para alcanzar el mayor grado de estabilización. Los resultados se presentan en la figura 5. En función de los resultados previos, este análisis se llevó a cabo únicamente con las cepas en fondo EC11118 en las que se habían eliminado las dos copias del gen correspondiente. El resultado principal es que en todos los casos se observa una estabilización mejor en las cepas delecionadas que en la cepa control, con una reducción aproximada de un 25% en la demanda de bentonita.

## ES 2 334 421 A1

Paralelamente se analizaron las manoproteínas restantes en el vino después de cada tratamiento, observándose que las muestras derivadas de las cepas modificadas conservaban, después del tratamiento, cantidades apreciablemente superiores de manoproteínas que la cepa control. Estos resultados se muestran en la figura 6.

5 Todos estos ejemplos muestran que las cepas recombinantes desarrolladas en esta invención dan lugar a vinos más ricos en manoproteínas, incluso después de un tratamiento con bentonita, más estables frente a quiebra proteica, y que requieren menos bentonita para su estabilización. Al ser más ricos en manoproteínas estos vinos tienen potencialmente mejoradas otros rasgos de calidad asociados a un alto contenido en manoproteínas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para obtener cepas de levadura recombinantes industriales, que aumentan la concentración de manoproteínas secretadas al medio, que comprende deleccionar en un fondo genético de cepas de *levadura* genes relacionados con la biogénesis de la pared celular o la liberación de proteínas.
- 10 2. Método según la reivindicación anterior, en el que las cepas pertenecen al género *Saccharomyces*.
3. Método según la reivindicación anterior, en el que las cepas pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el gen deleccionado se selecciona de una lista que comprende:
- 15 a. el gen *KNR4*,
- b. el gen *GPI7*,
- 20 c. el gen *FKSI*,
- d. el gen *GASI*,
- o cualquiera de sus combinaciones.
- 25 5. Método según la reivindicación 4, en el que el gen deleccionado es el *KNR4*.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que además se ha eliminado el gen marcador.
- 30 7. Cepas de levadura obtenidas por el método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
8. Cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con el número CECT 13012.
- 35 9. Uso de la cepa de *Saccharomycetales* obtenida según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* según la reivindicación 8, para la fermentación alcohólica.
- 40 10. Uso de la cepa de *Saccharomycetales* según la reivindicación anterior, donde la fermentación alcohólica da lugar a vinos.

40

45

50

55

60

65

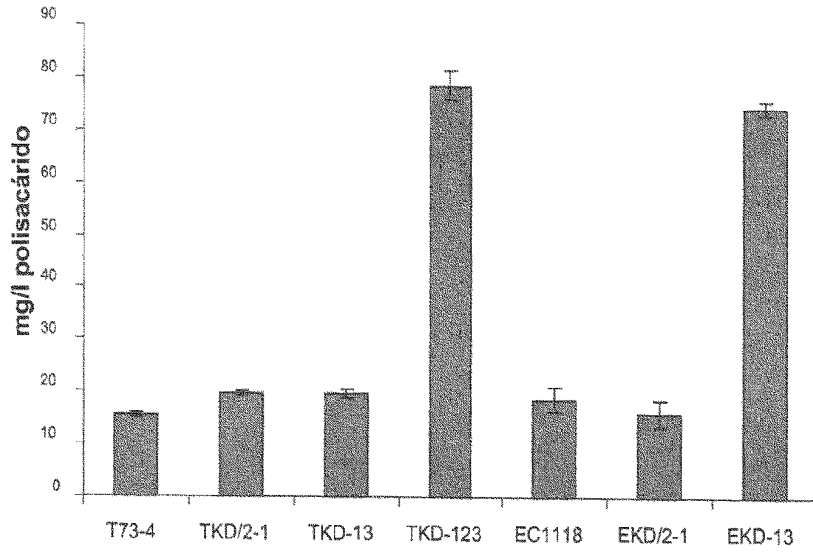


FIG. 1A

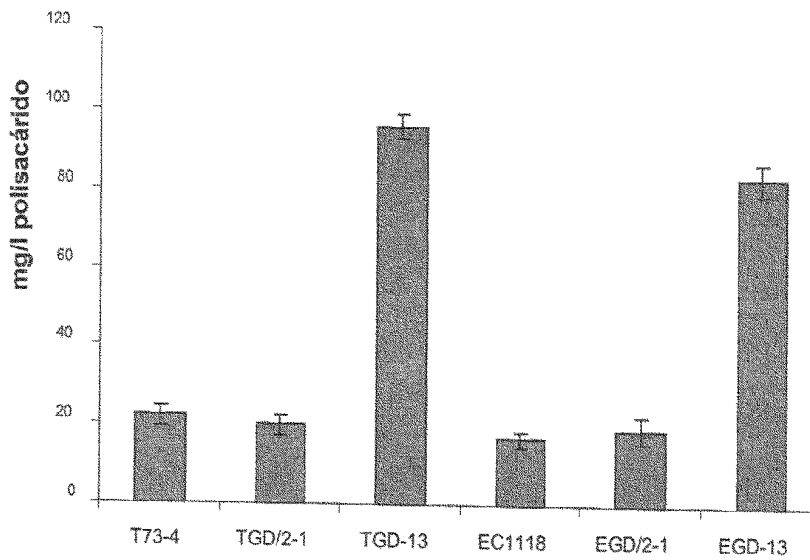


FIG. 1B

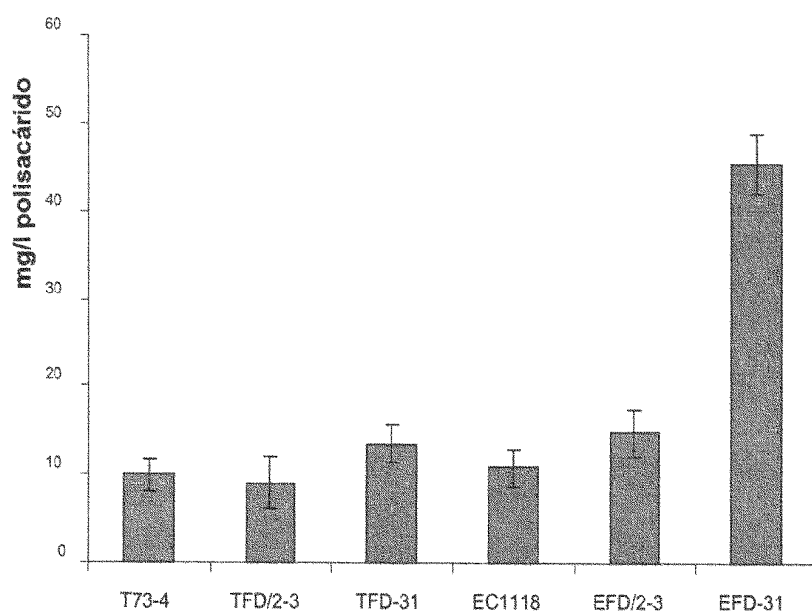


FIG. 1C

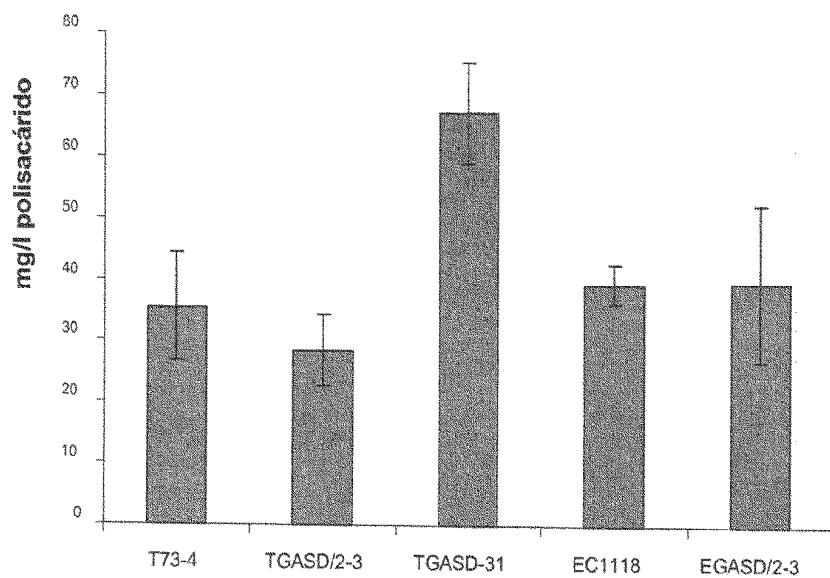


FIG. 1D

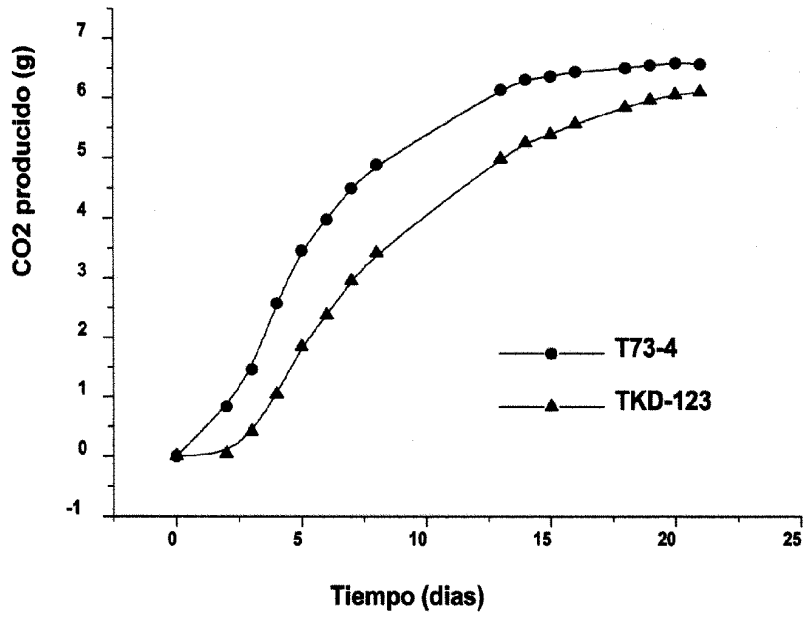


FIG. 2A

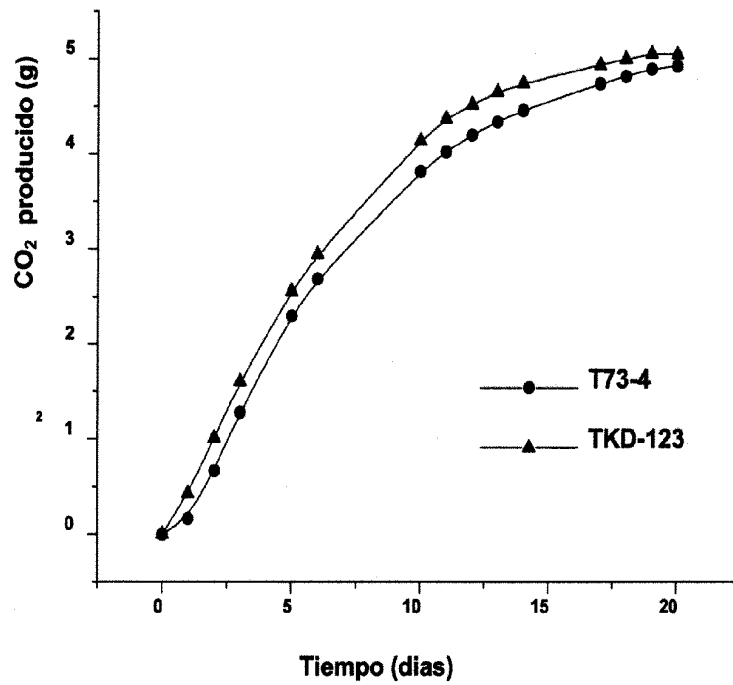


FIG. 2B

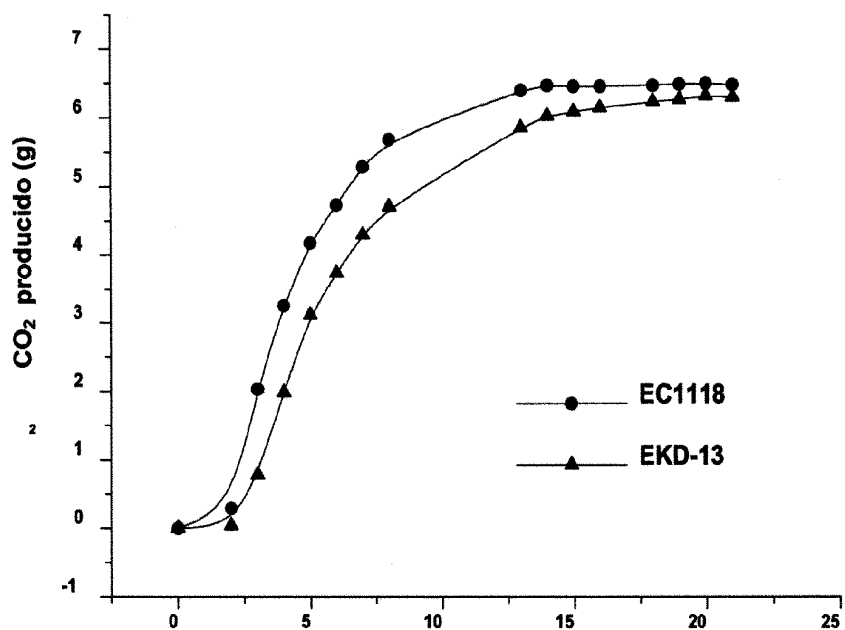


FIG. 2C

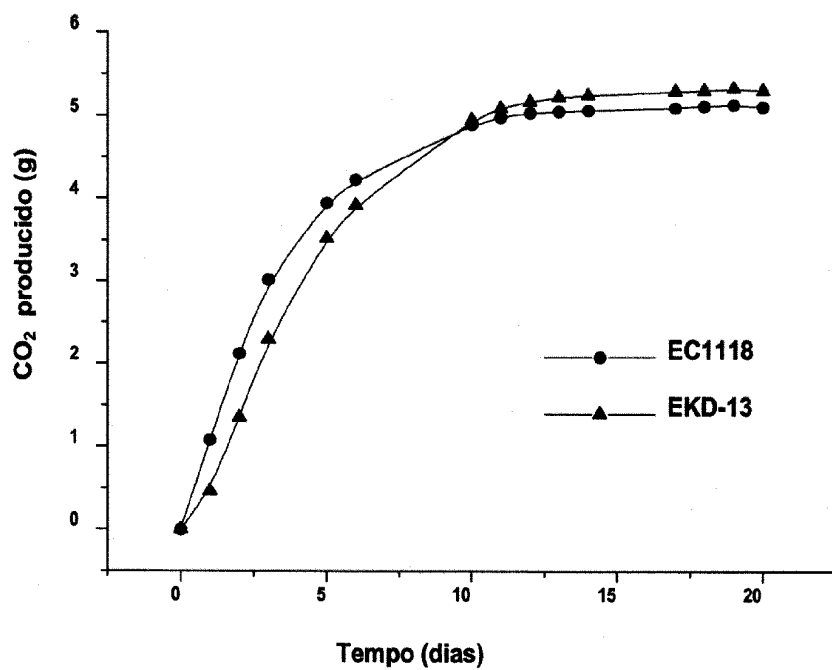


FIG. 2D



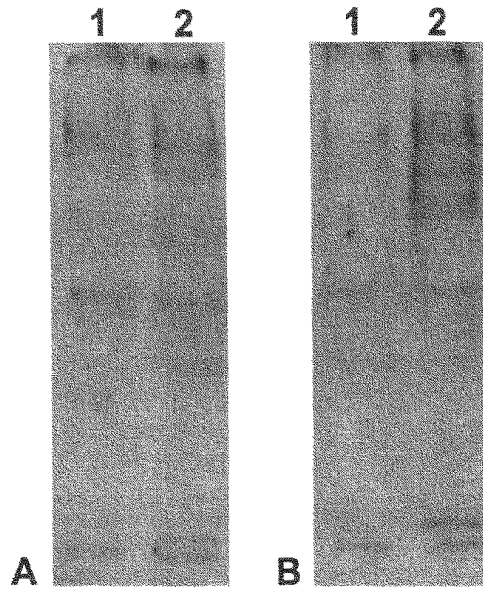


FIG. 3

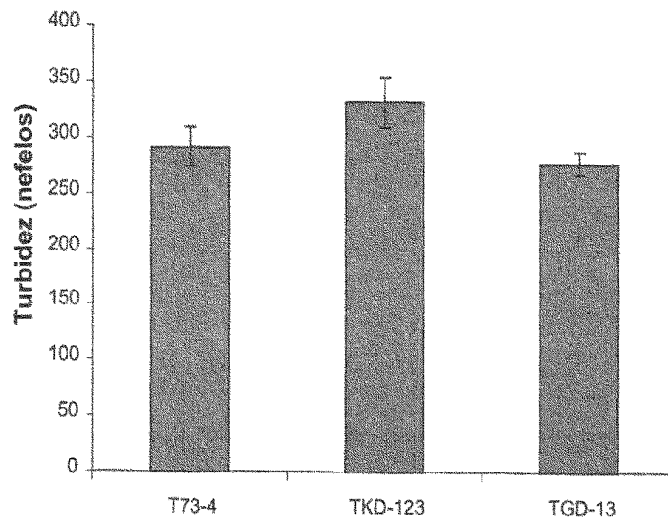


FIG. 4A

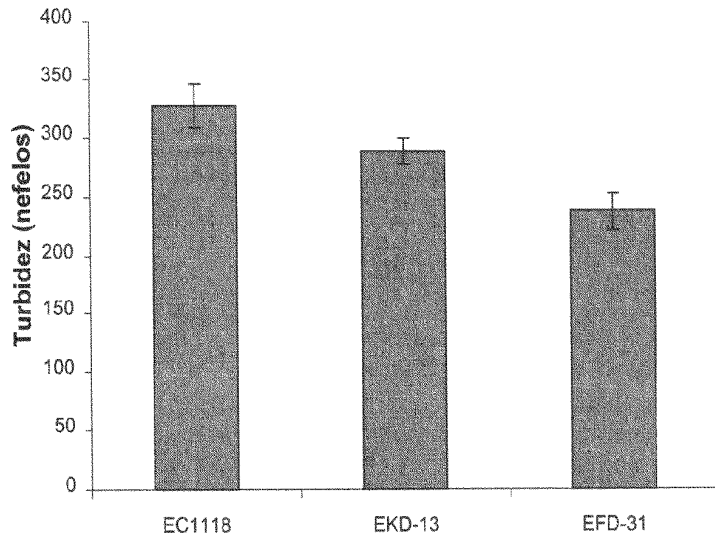


FIG. 4B

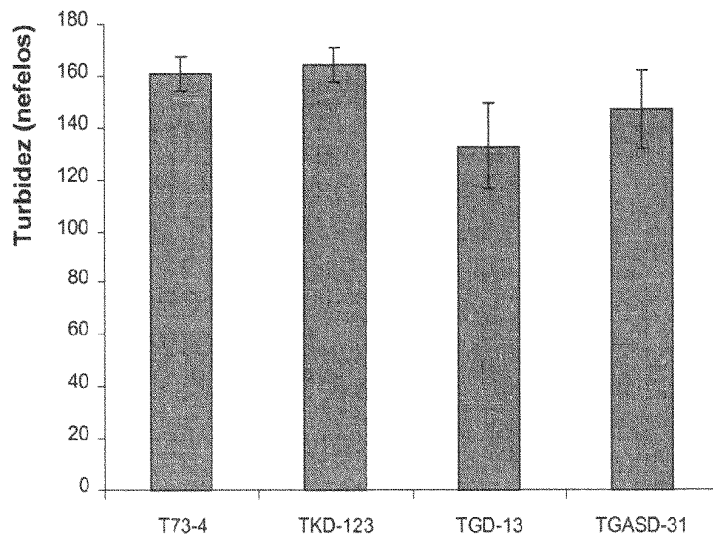


FIG. 4C

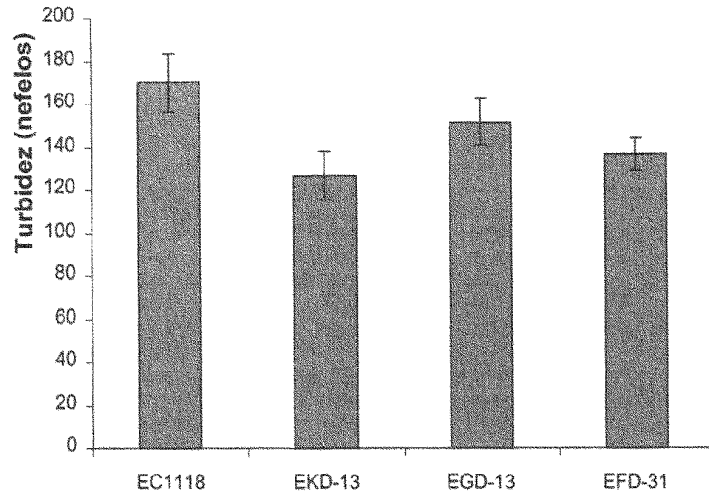


FIG. 4D

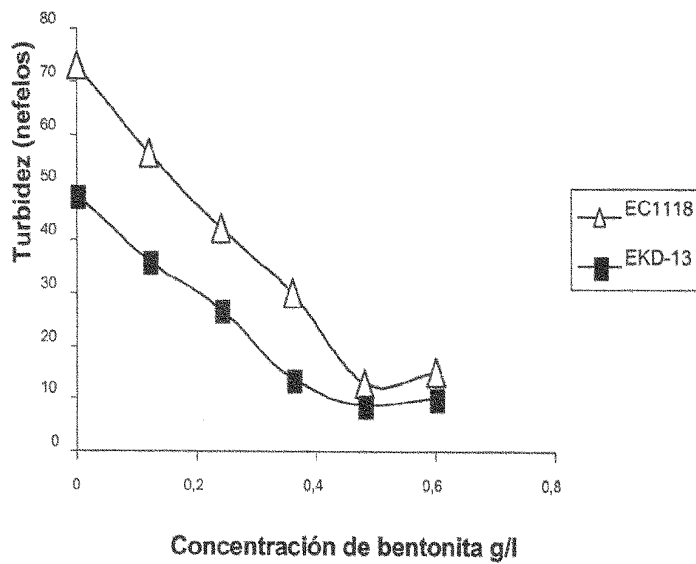


FIG. 5A

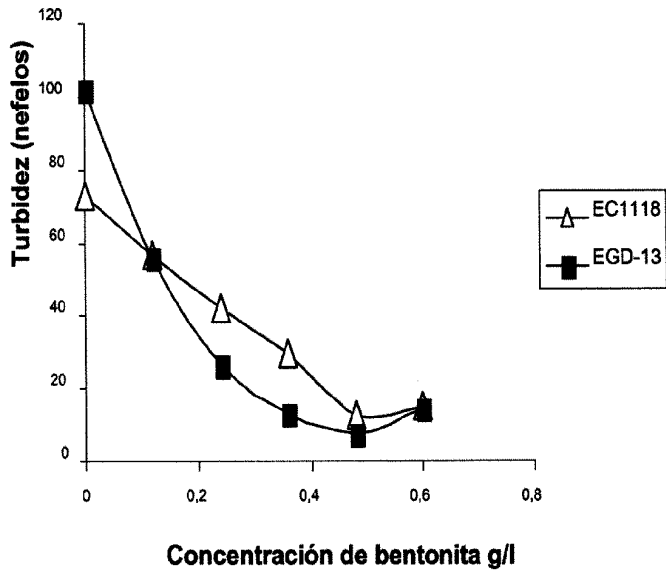


FIG. 5B

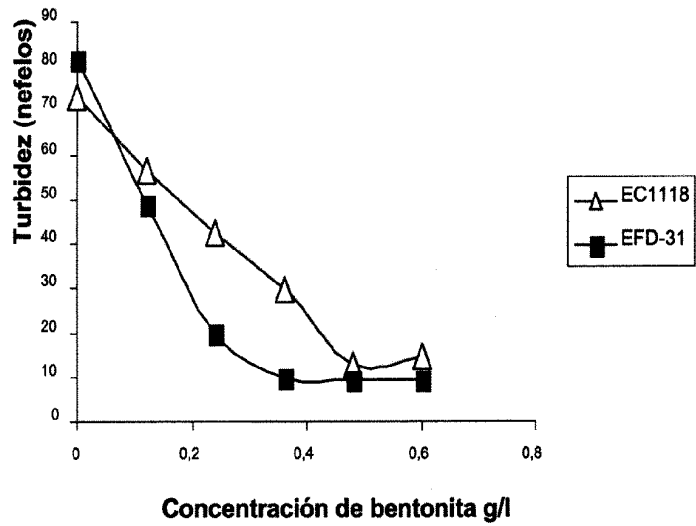


FIG. 5C

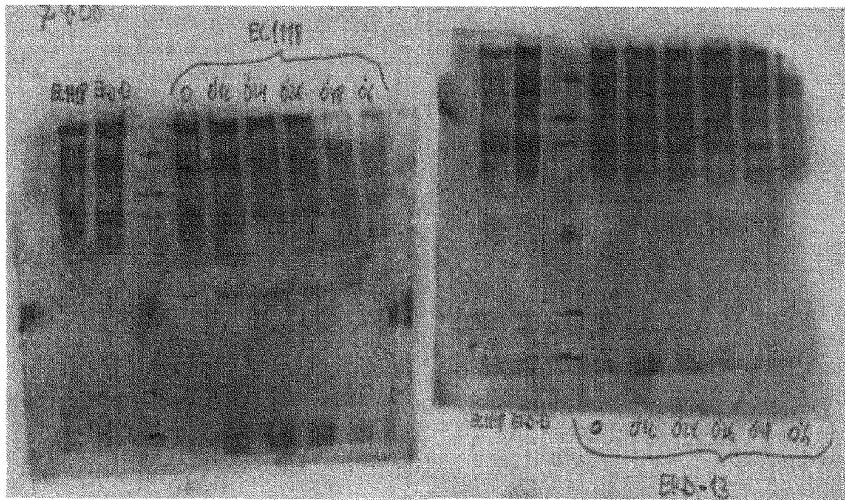


FIG. 6

# ES 2 334 421 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
- 5 <120> LEVADURAS VÍNICAS RECOMBINANTES
- <130> E51641.56
- 10 <160> 30
- <170> PatentIn version 3.4
- 15 <210> 1  
<211> 49  
<212> DNA  
20 <213> Artificial
- <220> ADN sintético  
<223> cebador TKARO-f
- 25 <400> 1
- ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggcttg gaccactgag ccctattg 49
- 30 <210> 2  
<211> 49  
<212> DNA  
35 <213> Artificial
- <220> ADN sintético  
<223> cebador TKARO-r
- 40 <400> 2
- ggtaccgagc tcgaattcac tggaaatc acaattaaca ttctacaac 49
- 45 <210> 3  
<211> 47  
<212> DNA  
50 <213> Artificial
- <220>  
<223> cebador PKARO-f
- 55 <400> 3
- ggatcctcta gagtcgacct gcctgccaag ttgtcgcta tagaacg 47
- 60 <210> 4  
<211> 48  
<212> DNA  
65 <213> Artificial

## ES 2 334 421 A1

<220> ADN sintético

<223> cebador PKARO-r

5 <400> 4

gattacgcca agcttgcatt cctgcttcca aagccctatt ggaggtcg

48

10 <210> 5

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

15

<220> ADN sintético

<223> cebador RURA3-f

20 <400> 5

tctagaggat ccccatggc gattcggtaa tctccgaaca gaag

44

25 <210> 6

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial

30

<220> ADN sintético

<223> cebador RURA3-r

35 <400> 6

ccagtgaatt cgagctcggc accgggtaat aactgatata attaaattga agctctaatt

59

40 <210> 7

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

45

<220> ADN sintético

<223> cebador RKAN3-f

50 <400> 7

tctagaggat ccccatggc taccagagg cccttctgc

40

55 <210> 8

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial

60

<220> ADN sintético

<223> cebador RKAN3-r

65 <400> 8

ccagtgaatt cgagctcggc acctcgtatga taagctgtca aacatgag

48

## ES 2 334 421 A1

<210> 9  
<211> 47  
<212> DNA  
5 <213> Artificial

<220> ADN sintético  
<223> cebador TGARO-f  
10  
<400> 9

ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggcatc gtgatagtgt catcctc 47

15  
<210> 10  
<211> 46  
<212> DNA  
20 <213> Artificial

<220> ADN sintético  
<223> cebador TGARO-r  
25  
<400> 10

ggtaccgagc tegaattcac tggggacagc gataattgag tggtag 46

30  
<210> 11  
<211> 44  
<212> DNA  
35 <213> Artificial

<220> ADN sintético  
<223> cebador PGARO-f  
40  
<400> 11

ggatcctcta gagtcgacct gcggggaagt gtgcgtggta gatg 44

45  
<210> 12  
<211> 44  
<212> DNA  
50 <213> Artificial

<220> ADN sintético  
<223> cebador PGARO-r  
55  
<400> 12

gattacgcca agcttgcacg cctgggtgca cgggctctgt ttac 44

60  
<210> 13  
<211> 48  
<212> DNA  
65 <213> Artificial



## ES 2 334 421 A1

	<220> ADN sintético	
	<223> cebador PFKS-f	
5	<400> 13	
	ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggcgtt ttgatgaagc acaggaag	48
10	<210> 14	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
15	<220> ADN sintético	
	<223> cebador PFKS-r	
20	<400> 14	
	ggfaccgagc tcgaattcac tgggaccgtt gtatgaaaga cttgatctc	49
25	<210> 15	
	<211> 47	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
30	<220> ADN sintético	
	<223> cebador TFKS-f	
35	<400> 15	
	ggatcctcta gagtgcacct gccaaactt gcttgaacgc ttgattt	47
40	<210> 16	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
45	<220> ADN sintético	
	<223> cebador TFKS-r	
50	<400> 16	
	gattacgcca agcttgcatt cctcaataat ggctgcgtaa aaattttg	48
55	<210> 17	
	<211> 54	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
60	<220> ADN sintético	
	<223> cebador PGAS-f	
65	<400> 17	
	ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggcaac accaacttta cctaccttta ggac	54

## ES 2 334 421 A1

	<210> 18	
	<211> 52	
	<212> DNA	
5	<213> Artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> cebador PGAS-r	
10	<400> 18	
	ggtaccgagc tcgaattcac tggctgtgtt tgtgttttt gttttatcag ac	52
15	<210> 19	
	<211> 52	
	<212> DNA	
20	<213> Artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> cebador TGAS-f	
25	<400> 19	
	ggatcctcta gagtcgacct gcgcttcgac acatacataa taactcgata ag	52
30	<210> 20	
	<211> 49	
	<212> DNA	
35	<213> Artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> cebador TGAS-r	
40	<400> 20	
	gattacgcca agcttgcatt cctgagcaaa ttgattgaaa ataattcgc	49
45	<210> 21	
	<211> 23	
	<212> DNA	
50	<213> Artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> cebador PromARO4Q	
55	<400> 21	
	ccacggctaa ttaggtgatc atg	23
60	<210> 22	
	<211> 22	
	<212> DNA	
65	<213> Artificial	

## ES 2 334 421 A1

<220> ADN sintético  
<223> cebador TermKNR4

5 <400> 22  
cgaaaaccca attaccataa gc 22

10 <210> 23  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial

15 <220> ADN sintético  
<223> cebador CDKNR-f

20 <400> 23  
acgtgacata tgtcattacc ctagattac 29

25 <210> 24  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial

30 <220> ADN sintético  
<223> cebador CDKNR-r

35 <400> 24  
ggttcgatgct ctccaatgtc gttac 25

40 <210> 25  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

45 <220> ADN sintético  
<223> cebador CDGPI-f

50 <400> 25  
cttttcaag gcaatatgct cg 22

55 <210> 26  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial

60 <220> ADN sintético  
<223> cebador CDGPI-r

65 <400> 26  
ttcaaaacga taggcttttc ttgc 24

## ES 2 334 421 A1

	<210> 27	
	<211> 25	
	<212> DNA	
5	<213> Artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> cebador CDFKS-f	
10	<400> 27	
	gaaatagtct cacttactgg gcgac	25
15	<210> 28	
	<211> 23	
	<212> DNA	
20	<213> Artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> cebador CDFKS-r	
25	<400> 28	
	ctgaagagcc atgagacaat tgc	23
30	<210> 29	
	<211> 23	
	<212> DNA	
35	<213> Artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> cebador CDGAS-f	
40	<400> 29	
	caacaacgat actgtccaa atg	23
45	<210> 30	
	<211> 23	
	<212> DNA	
50	<213> Artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> cebador CDGAS-r	
55	<400> 30	
	ctgacaaaaga agctgcctca ttc	23
60		
65		



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 334 421

② Nº de solicitud: 200801612

② Fecha de presentación de la solicitud: 29.05.2008

③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X		GONZALEZ-RAMOS DANIEL et al. "Genetic determinants of the release of mannoproteins of enological interest by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ". Journal of agricultural and food chemistry. 13.12.2006. Vol. 54, Nº 25, páginas 9411-9416. ISSN 0021-8561.	1-6,8
X		PARK S-M. et al. "ENHANCED EXTRACTION EFFICIENCY OF RECOMBINANT PROTEINS BY USE OF THE KNR4- DISRUPTED STRAINS OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE". BIOTECHNOLOGY LETTERS. 01.05.1998. Vol. 20, Nº. páginas 511-514. ISSN 0141-5492.	1-6,8 5,
A		LAGORCE ARNAUD et al. "Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ". The Journal of biological chemistry. 30.05.2003. Vol. 278, Nº 22, páginas 20345-20357. ISSN 0021-9258 (Print).	1-8
A		HONG Z. et al. "Cloning and characterization of KNR4, a yeast gene involved in (1,3)-beta-glucan synthesis". MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY. 01.02.1994. Vol. 14, Nº. 2, páginas 1017-102 ISSN 0270-7306.	1-8 .
A		KAPTEYN J. C. et al. "Altered extent of cross-linking of beta1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mutants with reduced cell wall beta1,3-glucan content". Journal of bacteriology. Oct. 1997. Vol. 179, Nº. 20, páginas 6279-628 ISSN 0021-9193 (Print).	1-8 .

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<b>Fecha de realización del informe</b> 23.02.2010	<b>Examinador</b> J. Manso Tomico	<b>Página</b> 1/5
---	--------------------------------------	----------------------

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N 1/16** (2006.01)

**C12N 15/81** (2006.01)

**C12G 1/022** (2006.01)

**C12R 1/865** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12G, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, NPL, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.02.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	7	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	1-6,8	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	7	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	1-6,8	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**Consideraciones:**

La presente opinión se ha hecho en base al nuevo juego de reivindicaciones presentadas el 08.02.2010.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Gonzalez-Ramos Daniel et al. "Genetic determinants of the release of mannoproteins of enological interest by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ". <i>Journal of agricultural and food chemistry</i> . 13. 12.2006. Vol. 54, N° 25, páginas 9411 - 9416. ISSN 0021- 8561.	13-12-2006
D02	PARK S-M. et al. "ENHANCED EXTRACTION EFFICIENCY OF RECOMBINANT PROTEINS BY USE OF THE KNR4- DISRUPTED STRAINS OF <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ". <i>BIOTECHNOLOGY LETTERS</i> . 01.05.1998. Vol. 20, N° 5, páginas 511 - 514. ISSN 0141-5492	01-05-1998
D03	Lagorce Arnaud et al. "Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ". <i>The Journal of biological chemistry</i> . 30.05.2003. Vol. 278, N° 22, páginas 20345 - 20357. ISSN 0021-9258 (Print).	30-05-2003
D04	HONG Z. et al. "Cloning and characterization of KNR4, a yeast gene involved in (1,3)-beta-glucan synthesis". <i>MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY</i> . 01.02.1994. Vol. 14, N° 2, páginas 1017 - 1025. ISSN 0270-7306.	01-02-1994
D05	Kapteyn J. C. et al. "Altered extent of cross- linking of beta1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mutants with reduced cell wall beta1,3-glucan content". <i>Journal of bacteriology</i> . Oct. 1997. Vol. 179, N° 20, páginas 6279 - 6284. ISSN 0021-9193 (Print).	1997

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud divulga una cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de aumentar la concentración de manoproteínas que secreta al medio, un método de obtención de esa cepa y el uso de la misma en la fermentación alcohólica para la obtención de vinos.

En concreto las reivindicaciones 1-5 hacen referencia al método, las reivindicaciones 6 y 7 a la cepa y la reivindicación 8 al uso.

Dada la falta de claridad y concisión de las características técnicas incluidas en las reivindicaciones 1-3, 6 : "delecionar o inactivar en un fondo genético.. genes relacionados con la biogénesis de la pared celular", sólo se han podido buscar en parte, en la medida que el gen delecionado es KNR4. Tomando en consideración lo anterior, las reivindicaciones 1-6, 8 no serían nuevas puesto que en el estado de la técnica ya se han divulgado cepas de *S. cerevisiae* en donde la delección de KNR4 ha dado lugar a un aumento en la cantidad de manoproteínas secretadas al medio (D1, resumen, tablas 1 y 2). Por lo tanto, el objeto reivindicado en tales reivindicaciones no es nuevo y la solicitud no cumpliría con lo mencionado en el art. 6 de la LP. Ninguno de los documentos citados como estado de la técnica divulga la cepa CECT 13012, por lo que la solicitud si cumpliría el art. 6, en relación con el objeto reivindicado en la reivindicación 7.



Hoja adicional

No sólo en D1, sino también en D2 se divulga el uso de cepas mutadas en KNR4 para la mejor extracción de proteínas recombinantes secretadas al medio, comprobándose la idoneidad de estos mutantes para tal fin (figura 3). Por tanto, sería obvio para el experto en la materia la provisión de métodos de tecnología recombinante conocidos aplicados al locus KNR4 para la obtención de Cepas de *S. cerevisiae* que den lugar a una extracción aumentada de proteínas al medio, y en concreto manoproteínas que aumenten la estabilidad de vinos de distinta procedencia. Sin embargo, el objeto de la reivindicación 7, no parece derivarse de manera obvia de los documentos del estado de la técnica, tomados solos o en combinación, por lo que parece implicar actividad inventiva, Así pues, la solicitud sólo cumpliría lo mencionado en el art. 8 de la LP para la cepa reivindicada en la reivindicación 7.