

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 338 085**

21 Número de solicitud: 200803092

51 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

22 Fecha de presentación: **30.10.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **03.05.2010**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
03.05.2010

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

72 Inventor/es: **González García, Ramón;**
González Ramos, Daniel;
Tabera Moreno, Laura y
Barcenilla Moraleta, José María

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Procedimiento para la obtención de levaduras vínicas superproductoras de manoproteínas mediante tecnologías no recombinantes.**

57 Resumen:

Procedimiento para la obtención de levaduras vínicas superproductoras de manoproteínas mediante tecnologías no recombinantes.

Procedimiento para obtener cepas de levaduras superproductoras de manoproteínas mediante la selección de mutantes resistentes a la toxina K9, cepas obtenibles por dicho procedimiento y usos.

ES 2 338 085 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la obtención de levaduras vínicas superproductoras de manoproteínas mediante tecnologías no recombinantes.

La presente invención se encuentra dentro del campo de la mejora genética de microorganismos aplicada a la alimentación, y más específicamente en el campo de la enología. En concreto se refiere a un método para la obtención de levaduras vínicas mejoradas que secretan mayor cantidad de manoproteínas que las cepas originales, sin necesidad de utilizar técnicas de ingeniería genética. El método se basa en la obtención de mutantes al azar combinado con un método novedoso de selección de los mutantes que permite indirectamente la selección de las cepas que secretan más manoproteínas, sin necesidad de utilizar métodos poco eficientes para la selección directa de esta característica.

Estado de la técnica anterior

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 y la enología, es fundamental para el desarrollo y expansión de esta industria.

Las manoproteínas de la pared celular de *S. cerevisiae* tienen un enorme interés en enología debido a su contribución positiva a la calidad de todo tipo de vinos (blancos, rosados, tintos y espumosos) a través de su influencia en numerosos aspectos sensoriales y tecnológicos (Candi, A. 2006. *Antonie van Leeuwenhoek*, 89: 417-422).

La estabilización química de los vinos blancos fue una de las primeras propiedades enológicas descritas para las manoproteínas. Así los vinos enriquecidos en manoproteínas mediante la crianza sobre lías o mediante adición directa son más estables frente a quiebra proteica (Waters *et al.*, 2000. *Aust. Grapegrower Winemaker*, 438a: 13-16; Ledoux *et al.*, 1992. *J. Int. Sci. Vigne Vin*. 26 : 239-251) y tartárica (Feuillat *et al.*, 1998. *Bull. O.I.V.* 71: (813-814), 945-967).

De manera aún más interesante, la riqueza en manoproteínas del vino se correlaciona con propiedades relacionadas con la calidad sensorial, tales como: (1) la retención de compuestos del aroma (Lubbers *et al.*, 1994. *Debensm.-Wiss.u.-Technol.* 27: 108-114; Wolz, S. 2005. *Deutsche Weinmagazin* 22: 21-25); (2) la reducción de la astringencia (Escot *et al.*, 2001. *Aust J Grape Wine Res.* 7 (3): 153-159); (3) el aumento del cuerpo y redondez en boca (Wolz, S. 2005. *Deutsche Weinmagazin*. 22: 21-25; Vidal *et al.*, 2004. *Food Chem.* 85 (4):519-525; Saucier *et al.*, 1999. *Revue des Oenologues et des Techniques Vitivinicoles et OEnologiques* 94: 9-10), características especialmente apreciadas en los vinos tintos junto con (4) el color, a cuya estabilidad también contribuyen la manoproteínas (Escot *et al.*, 2001. *Aust. J. Grape Wine Res.* 7:153-159).

Por último las manoproteínas parecen (5) estimular el crecimiento de las bacterias lácticas y consecuentemente la fermentación maloláctica (Rosi *et al.*, 1999. *Revue des Oenologues et des Techniques Vitivinicoles et OEnologiques*. 94 : 18-20; Guilloux-Benattier *et al.*, 1995. *Am J. Enol. Vitic.* 46 (4): 486-492), así como (6) mejorar la calidad de la espuma de los vinos espumosos (Feuillat, M. 1987. *Revue Française d'OEnologie*. 109:17-27; Feuillat, M. 2003, *Am J. Enol. Vitic.* 54(3): 211-213).

La cepa concreta de levadura es uno de los factores más importantes responsables de la cantidad de manoproteínas presentes en el vino al final del proceso de elaboración. Existe por lo tanto un interés creciente por el desarrollo de cepas de levaduras que liberen mayores cantidades de manoproteínas que las actualmente disponibles, o simplemente por mejorar la liberación de manoproteínas en cepas con otras propiedades enológicas positivas ya contrastadas (cepas comerciales). La mejora genética clásica, y en concreto la mejora de cepas de levadura mediante mutagénesis al azar, es una herramienta potencial mente interesante para la mejora genética de cepas de levadura vínica (Cebollero *et al.*, 2007. *Biotechnol. Lett.* 29: 191-200). La mejora genética de cepas vínicas ya seleccionadas, y con utilidad enológica contrastada, tiene la ventaja sobre la selección de cepas directamente de la naturaleza de que todas estas propiedades ya están comprobadas y se trata simplemente de introducir una nueva características que haga más interesante la cepa en cuestión.

Sin embargo los métodos clásicos de mejora genética, y en particular la mutagénesis al azar, encuentran importantes limitaciones cuando no existe un procedimiento sencillo de selección de los mutantes deseados. Esto ocurre por ejemplo para caracteres cuantitativos (como la producción de etanol, glicerol u otros metabolitos), y especialmente cuando son difíciles de medir, como la producción de manoproteínas. En este contexto, disponer de un sistema de selección que permita identificar fácilmente los clones de interés, aunque sea de manera indirecta, constituye una ventaja sin la cual es casi imposible abordar estos procesos de mejora genética. Un incremento en la liberación de manoproteínas de un 50%, siendo tecnológicamente muy relevante, es muy difícil de detectar directamente mediante un análisis sencillo en placa con el estado de la técnica previo a la presente invención.

La aplicación de métodos clásicos de mejora genética a la obtención de cepas de levadura con una capacidad incrementada de secreción de manoproteínas se enfrenta con el problema de que la cuantificación de manoproteínas es compleja, y además no existen métodos en placa para diferenciar las colonias de levadura en función de su capacidad de liberar manoproteínas. Dado que en estos experimentos la frecuencia esperada de mutaciones que den lugar a un incremento en la liberación de manoproteínas es baja, la obtención de mutantes supersecretadores de manoproteínas a partir de una cepa industrial de interés era prácticamente imposible utilizando los métodos hasta ahora disponibles.

Aunque existen métodos para obtener cepas supersecretoras de manoproteínas (González-Ramos *et al.*, 2008. *Appl. Environ. Microbiol.* en prensa), dichos métodos dan lugar a microorganismos recombinantes, cuya utilidad industrial está actualmente impedida por las restricciones legales a su utilización y etiquetado, contenidas en normativas europeas y estatales, así como en el ámbito específico de la enología las limitaciones impuestas por la OIV y los Consejos Reguladores de las D.O.

Descripción de la invención

Existe una necesidad de obtener levaduras vínicas que produzcan durante la fermentación mayores cantidades de manoproteínas que las cepas actualmente disponibles. Estas manoproteínas contribuyen de manera positiva a la calidad de todos los tipos de vino, mediante la retención de compuestos del aroma, estabilización del color (vinos tintos), reducción de la astringencia, aumento del cuerpo y redondez en boca, estimulación de la fermentación maloláctica, y estabilidad y calidad de la espuma (de los vinos espumosos).

Los autores de la presente invención han desarrollado un método de selección que permite llevar a cabo un cribado previo, mediante el fenotipo en placa, de los mutantes con mayor potencial de liberación de manoproteínas. De esta manera, en un experimento de mutagénesis clásica, se consiguen rápidamente mutantes que liberan más manoproteínas que la cepa original. Por tanto, el procedimiento de la invención permite identificar, en un experimento de mutagénesis al azar, en presencia de un número elevado de células, mutantes que liberan mayores cantidades de manoproteínas que la cepa original mediante selección visual directa en placa.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para obtener cepas de levadura superproductoras de manoproteínas (de aquí en adelante método de la invención) que comprende:

- a) crecer una levadura de interés en un medio adecuado,
- b) inducir variabilidad genética en la levadura de a), y
- c) seleccionar los mutantes o segregantes resistentes a la toxina K9.

Estas cepas de levadura serían cepas no-recombinantes con aplicación industrial, que aumentan la concentración de manoproteínas secretadas al medio, estabilizando el vino resultante frente a la quiebra proteica, e incrementando las cualidades sensoriales y organolépticas del vino resultante.

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 *Harisenciaspora* (principalmente *H. uvarum*).

Así, en una realización preferida de este aspecto de la invención, la levadura del paso a) pertenece al género *Saccharomyces*. En otra realización aún más preferida de este aspecto de la invención, la levadura del paso a) pertenece a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

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*.

El medio de cultivo empleado para el crecimiento de las levaduras puede ser cualquier medio conocido en el estado del arte.

Las fuentes principales de variabilidad genética son la recombinación (sexual o parasexual en el caso de las levaduras), las mutaciones, el flujo genético y la deriva genética. La variabilidad causada por las mutaciones inducidas no es esencialmente diferente de la causada por las mutaciones espontáneas durante la evolución. El uso directo de las mutaciones es una herramienta muy valiosa para el mejoramiento de los organismos, particularmente cuando se desea mejorar uno o dos caracteres fácilmente identificables. De realizarse *in vitro*, dicha alteración puede realizarse al azar (mutagénesis al azar), sobre cualquier secuencia, o bien de forma dirigida (mutagénesis dirigida) sobre una secuencia conocida y en la posición de interés. En el caso de realizarse al azar se emplean agentes mutagénicos. En el mejoramiento mediante inducción de mutaciones se utilizan básicamente dos tipos de agentes mutagénicos:

1. *Mutágenos químicos*. El número de mutágenos químicos es muy grande y continuamente se está incrementando. La mayoría de ellos pertenecen al grupo de los agentes alquilantes y dentro de ellos se pueden señalar los siguientes: metanosulfonato de etilo (EMS), sulfato de dietilo (dES) y a los compuestos nitrosos como la N-metil-N-nitrosourea (MNH). Una sustancia química de interesantes características, cuya utilización como inductor de mutaciones es la azida sódica. Los principales grupos de mutágenos químicos son:

- a). Análogos de bases.

ES 2 338 085 A1

- b). Antibióticos.
- c). Agentes alquilantes.
- 5 d). Otros compuestos.

2. *Radiación mutagénica (mutágenos físicos)*. En los últimos años existe la tendencia a incrementar el uso de las radiaciones sobre los mutágenos químicos. Los principales tipos de radiación son los siguientes:

- 10 a) Rayos X.
- b) Radiación Gamma: Cesio137 y Cobalto60 las principales fuentes de rayos Gamma utilizados en trabajos de radiobiología. El Cesio137 es usado en muchas instalaciones teniendo en cuenta que tiene una vida media más larga que el Cobalto60.
- 15 c) Radiación Ultravioleta: Tiene limitada habilidad de penetración en los tejidos y suele aplicarse frecuentemente al tratamiento de esporas o granos de polen.
- 20 d) Radiación Beta: Las partículas Beta (electrones) como de ³²P y ³⁵S producen un efecto similar a aquellos rayos X o Gamma, pero con más baja habilidad de penetración.
- e) Neutrones: Tienen un amplio rango de energía y son obtenidos de la fisión nuclear en un reactor nuclear con ²³⁵U. Los neutrones han mostrado ser muy efectivos en la inducción de mutaciones en plantas.
- 25 f) Partículas de aceleradores: Protones, deuterones, partículas alfa. Se ha utilizado básicamente para estudios fundamentales en la determinación de los efectos radiobiológicos.

30 La radiación ultravioleta (UV) tiene un efecto letal y mutagénico, dependiendo de su longitud de onda. Los rayos UV no tienen actividad ionizante, pero provocan cambios químicos en las moléculas absorbentes, de modo que aparecen moléculas alteradas denominadas genéricamente fotoproductos. Los fotoproductos generados por la luz UV en el ADN derivan principalmente de alteraciones en las bases pirimidínicas (citosina, timina).

35 Así, en otra realización preferida de este aspecto de la invención la variabilidad genética se induce mediante mutagénesis al azar. En una realización más preferida la mutagénesis al azar se realiza mediante radiación ultravioleta.

40 La selección de los mutantes se puede hacer mediante diversos métodos. Así, los más utilizados son la selección del auxotrofo, midiendo la capacidad de fermentación de azúcares, su termosensibilidad o midiendo su resistencia a fármacos o toxinas.

45 Los autores de la presente invención han observado que los mutantes resistentes a la toxina killer K9 son capaces de liberar más manoproteínas que la cepa original.

50 Las “toxinas killer” son toxinas de naturaleza proteica y con actividad demostrada contra un gran número de patógenos humanos, tanto de origen fúngico como bacteriano producidas por distintas especies de levaduras procedentes de los ambientes más diversos. Se han caracterizado diferentes tipos de toxinas, las que se diferencian por su inmunidad cruzada y por sus mecanismos de acción. No obstante e independientemente del tipo al que pertenecen y del mecanismo por el que ejercen su acción, todas las toxinas killer descritas hasta el presente necesitan unirse a receptores específicos de la pared celular de sus células blanco para ejercer su acción biológica: muerte o detención del ciclo celular de la población sensible.

55 La “toxina K9” es una toxina killer producida por *Williopsis saturnus* var. *mrakii* CECT 11031 (Kurtzman, C.P. 1991. *Antonie van Leeuwenhoek* **60** (1): 18, cuyo basiónimo es *Hansenula mrakii* Wick. y el nombre corriente es *Williopsis mrakii* (Wick.) G.I. Naumov & Vustin.

60 Otro aspecto de la invención se refiere a las cepas de levadura obtenibles por el método de la invención, de ahora en adelante cepas de levadura de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de las cepas de levadura de la invención, u obtenibles por el método de la invención, para la fermentación alcohólica. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la fermentación alcohólica da lugar a vinos.

65 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.

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.

10 Breve descripción de las figuras

Fig. 1. Polisacáridos liberados por la cepa original (T1) y tres cepas mutantes resistentes a la toxina K9. Se muestran cultivos (Fig. 1A y Fig. 1B) realizados en dos semanas diferentes. Los valores mostrados en cada gráfica corresponden a la media y desviación estándar de cinco determinaciones.

15 Exposición detallada de modos de realización

A continuación se ilustrará la invención mediante ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la utilidad del método desarrollado para la selección de nuevas cepas, derivadas de una cepa natural aislada de vino, T1, que muestran un incremento en la liberación de manoproteínas.

Producción de toxina K9 y elaboración del medio selectivo

Se preparó medio YPD *yeast-peptone-dextrose* o levadura-peptona-dextrosa tamponado (peptona 2%, extracto de levadura 1%, glucosa 2%, ácido cítrico 1%, pH con tampón citrato 50 mM, pH ajustado a 4,3 con NaOH) y se hizo crecer *Williopsis saturnus* var. *mrakii* (CECT 11031) a 19°C y 150 rpm durante 4 días. Una vez crecido el cultivo se centrifugó y se tomó el sobrenadante que se filtró (0,2 μ m) y se matuvo a 4°C hasta el momento de la preparación del medio.

Para preparar medio YPD+K9 se prepararon en primer lugar placas de YPD tamponado (con el 2% de agar), y una vez solidificadas y secas las placas, se depositaron 6 ml de la preparación de toxina K9 (preparada según el párrafo anterior), dejándose las placas abiertas en la cabina de flujo laminar hasta la completa absorción, con removidos puntuales para facilitar la homogeneización (una dos horas).

35 *Mutagénesis con luz UV*

Se creció la cepa durante toda la noche a 30°C y 150 rpm en medio YPD. A la mañana siguiente las células se lavaron en solución salina y se diluyó el cultivo en solución salina estéril para tener unas 10^7 células por mililitro. 10 ml de esta suspensión se irradiaron (en una placa Petri, con agitación orbital) con luz UV de 254 nm, (distancia de la lámpara 20 cm, lámpara precalentada durante 30 minutos). Tras la irradiación se conservaron las células en la oscuridad durante dos horas antes de plaquear las suspensiones y diluciones apropiadas de las mismas. Cuando se analizó el número de colonias formadas en placas de YPD a 30°C se obtuvo una supervivencia del 15% con 1 minuto de tratamiento.

45 *Selección de mutantes resistentes a la toxina K9*

Una vez verificada la tasa de supervivencia, a partir de la suspensión que presentaba una tasa del 15%, que se había guardado a 4°C, se plaquearon diluciones apropiadas en placas de YPD+K9 y se incubaron también a 30°C hasta la aparición de colonias. Las tres primeras colonias que aparecieron, al cabo de 48 horas, se replicaron una vez más en placas de YPD+K9, comprobándose el incremento de resistencia a la toxina en comparación con la cepa T1 original. Se aislaron colonias de cada uno de estos mutantes para tener cultivos puros para posteriores análisis.

Liberación de manoproteínas por los mutantes resistentes a K9

Se inoculó medio GCY (2% glucose, 2% Bacto Casaminoacids, 0.67% Difco Yeast Nitrogen Base) con cada cepa, a una D0600 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 la cepa parental, T1, y los tres mutantes. La elección daba lugar a un crecimiento ligeramente más lento en algunas de las cepas.

Se midió la cantidad de polisacáridos liberada durante el crecimiento en medio GCY. 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 *et al.*, 1995. *Am J. Enl. Vitic.* 46:564-570). Se realizaron cinco réplicas de cada determinación y se calcularon valor medio y desviación estándar. El experimento se repitió en dos días diferentes y los resultados se muestran en la figura 1. Se aprecia claramente que el mutante Mut K9-2 libera una cantidad muy superior de polisacáridos a la que libera la cepa control.

ES 2 338 085 A1

Por lo tanto, mediante la selección de mutantes resistentes a la toxina K9 se ha conseguido el enriquecimiento de mutantes que liberan cantidades superiores de manoproteínas que la cepa original. El método de selección es en principio aplicable a cualquier otra cepa de levadura de partida, por lo tanto abre la puerta para generar, a partir de cualquier cepa industrial de interés, cepas mejoradas en cuanto a esta interesante característica tecnológica.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para obtener cepas de levaduras superproductoras de manoproteínas que comprende:

5

- a. crecer una levadura de interés en un medio adecuado,
- b. inducir variabilidad genética en la levadura de a), y
- c. seleccionar los mutantes o segregantes resistentes a la toxina K9.

10

2. Procedimiento según la reivindicación anterior, en el que la levadura del paso a) pertenece al género *Saccharomyces*.

15

3. Procedimiento según la reivindicación anterior, en el que la levadura del paso a) pertenece a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

20

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la variabilidad genética se induce mediante mutagénesis al azar.

20

5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la mutagénesis se realiza mediante radiación ultravioleta.

6. Cepas de levadura obtenibles por el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

25

7. Uso de las cepas de levadura según la reivindicación 6 para la fermentación alcohólica.

8. Uso de las cepas de levadura según la reivindicación anterior, donde la fermentación alcohólica da lugar a vinos.

30

35

40

45

50

55

60

65

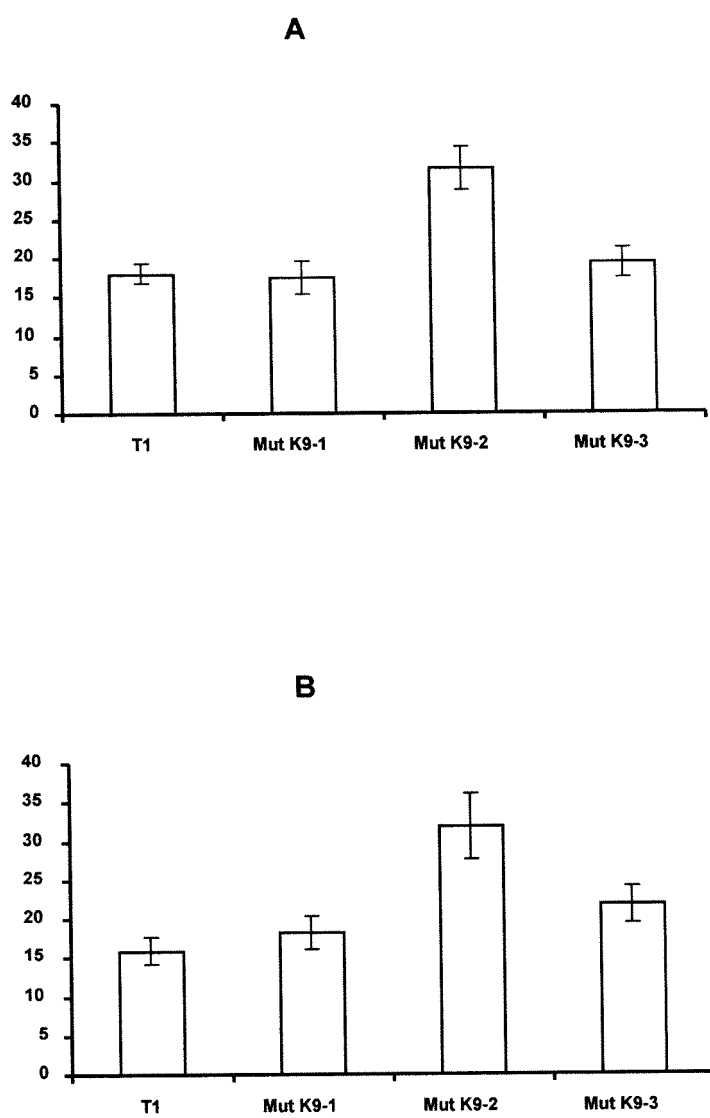


FIG. 1



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 338 085

② Nº de solicitud: 200803092

③ Fecha de presentación de la solicitud: **30.10.2008**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	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 1017-1025. ISSN 0270-7306.	1-8
A	MARTIN HELENE et al. "KNR4, a suppressor of Saccharomyces cerevisiae cwh mutants, is involved in the transcriptional control of chitin synthase genes". Microbiology (Reading). 1999. Vol. 145, Nº. 1, páginas 249-258. ISSN 1350-0872.	1-8
A	GONZALEZ-RAMOS DANIEL et al. "Genetic determinants of the release of mannoproteins of enological interest by Saccharomyces cerevisiae". Journal of agricultural and food chemistry. 13.12.2006. Vol. 54, Nº 25, páginas 9411-9416. ISSN 0021-8561.	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:

Fecha de realización del informe
09.02.2010

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/4

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.02.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-8	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-8	NO

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.

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	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 - 1025. ISSN 0270-7306	1994
D02	Martin Helene et al. "KNR4, a suppressor of Saccharomyces cerevisiae cwh mutants, is involved in the transcriptional control of chitin synthase genes". Microbiology (Reading). 1999. Vol. 145, Nº. 1, páginas 249-258. ISSN 1350-0872	1999
D03	Gonzalez-Ramos Daniel et al. "Genetic determinants of the release of mannoproteins of enological interest by Saccharomyces cerevisiae". Journal of agricultural and food chemistry.13. 12.2006. Vol. 54, Nº 25, páginas 9411 - 9416. ISSN 0021- 8561.	2006

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 se refiere a un procedimiento para obtener una cepa de levadura superproductora de manoproteínas resistente a la toxina K9.

En concreto, las reivindicaciones 1-5 se refiere al procedimiento de obtención de la cepa de levadura, la reivindicación 6 se refiere a una cepa obtenible por el procedimiento y las reivindicaciones 7 y 8 se refiere al uso de la cepa para la fermentación alcohólica que de lugar a vinos.

El documento D01 divulga el mutante KNR4, de Saccharomyces, que muestra una elevada resistencia a la toxina k9. Por tanto, dado que las reivindicaciones de procedimiento caracterizan el proceso por el resultado a obtener (seleccionar los mutantes resistentes a la toxina k9) , haciendo referencia a las etapas del procedimiento de manera general, cualquier procedimiento que tenga como resultado un mutante de Saccharomyces resistente a la toxina k9, anula la novedad de las reivindicaciones. De la misma manera, la cepa reivindicada por el proceso de obtención se refiere a una cepa resistente a la toxina k9, independientemente del proceso por el que haya sido producida. Por esa razón, el mutante KNR4 parece ser inherentemente el mismo, o indistinguible, de la cepa reivindicada en la presente solicitud. Asimismo, es de sobra conocido el potencial uso de los mutantes de saccharomyces en la obtención de vinos.

Por lo anteriormente expuesto, la presente solicitud no cumpliría con lo mencionado en los art. 6 y 8 de la LP.