



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 336 171**

② Número de solicitud: 200702111

⑤ Int. Cl.:

**C12N 9/64** (2006.01)

**C12N 15/67** (2006.01)

**C12N 15/81** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **27.07.2007**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **08.04.2010**

Fecha de la concesión: **28.04.2011**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **11.05.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**11.05.2011**

⑦ Titular/es:  
**Universidade de Santiago de Compostela  
Edificio CACTUS-CITT-Campus Sur  
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

⑦ Inventor/es: **Ageitos Martínez, José Manuel;  
Vallejo Vidal, Juan Andrés;  
Poza Domínguez, Margarita y  
González Villa, Tomás**

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Uso de la quimosina recombinante activa.**

⑤ Resumen:

Uso de la quimosina recombinante activa.  
Uso del cuajo, sin activación previa, obtenido a partir de una célula hospedadora que contiene un vector de expresión que comprende cualquiera de las secuencias que codifican para las proteínas de búfalo seleccionadas del grupo: preproquimosina, proquimosina o quimosina, para la coagulación de la leche.

ES 2 336 171 B1

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

## DESCRIPCIÓN

Uso de la quimosina recombinante activa.

5 La presente invención se refiere al uso de quimosina recombinante de búfalo para la elaboración de queso. Esta quimosina se produce en su forma activa por ser directamente secretada por el microorganismo hospedador, sin necesidad de un proceso de activación auto-catalítico intermedio mediado por pH.

**Estado de la técnica anterior**

10 Los cuajos empleados en la industria quesera están compuestos básicamente por proteasas aspárticas (cfr. Ustunol & Hicks., 1990, *Journal of Dairy Science*, vol. 73(1), pp. 8-16). Las proteasas aspárticas poseen dos residuos de ácido aspártico esenciales para su funcionamiento; Asp32 y Asp215. Esta característica, junto con su conformación tridimensional bilobulada, donde el centro activo, rico en ácido aspártico, se sitúa entre ambos lóbulos, les confiere la  
15 capacidad de actuar sobre el enlace peptídico Phe105-Met106 existente en la  $\kappa$ -caseína de la leche, originando para- $\kappa$ -caseína insoluble (cfr. McMahon *et al.*, 1984, *Journal of Dairy Science*, vol. 67(5), pp. 919-29). Esto conduce a la coagulación de la leche, lo que explica que estas proteasas se hayan estado empleando para la elaboración tradicional de masas queseras como paso previo a la fabricación de distintos tipos de quesos.

20 La quimosina es la proteasa aspártica más valorada en la industria quesera como fuente de cuajo por su eficiencia a la hora de elaborar masas queseras (cfr. Rao *et al.*, 1998, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 62 (3), pp. 597-635). Otras proteasas aspárticas empleadas en la industria quesera originan digestiones inespecíficas de las caseínas de la leche y pueden dar lugar a productos que dan sabor amargo a las masas queseras y a pérdidas del contenido proteico durante el desuerado, lo cual provoca una disminución importante del rendimiento en el proceso  
25 de elaboración de queso (cfr. Beppu., 1983, *Trends in Biotechnology*, vol. 1(3), pp. 85-9).

La quimosina se sintetiza *in vivo* en forma de preproquimosina que contiene un péptido señal de 16 aminoácidos, que es eliminado para originar proquimosina. La proquimosina, a su vez, es procesada a quimosina activa al ser sometida a las condiciones de pH ácido existentes en el estómago que ocasionan la eliminación de un propéptido de 42  
30 aminoácidos ubicado en el extremo aminoterminal (cfr. V B Pedersen *et al.*, 1979, *European Journal of Biochemistry*, vol. 94(2), pp. 573-80).

En la actualidad existen cuatro fuentes de producción de cuajo de distinto origen para la industria quesera: las animales, las vegetales, las microbianas y las recombinantes. El cuajo de origen animal (quimosina) se ha estado  
35 obteniendo tradicionalmente a partir del prensado directo de cuajares de terneros lechales. Este cuajo de origen animal es incapaz de cubrir la demanda actual del mercado. Y, además, con su uso existe el riesgo de aparición de impurezas debido al método de extracción, y también un riesgo de incorporación agentes infecciosos (por ej. Creutzfeld-Jacob).

Por su parte, los cuajos de origen vegetal se han estado obteniendo a partir de infusiones de flores tales como  
40 *Cynara cardunculus* (cfr. Cordeiro *et al.*, 1994, *Plant Molecular Biology*, vol. 24(5), pp. 733-41) o *Gallum verum*. Estos cuajos son incapaces de competir industrialmente por lo que se han quedado relegados a la obtención de quesos tradicionales y su uso ha sido reducido a áreas geográficas determinadas.

Los cuajos microbianos se obtienen fundamentalmente a partir de los sobrenadantes de cultivos de microorganismos como *Endothia* (cfr. Droehse, Helle B *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology*, vol. 995(3), pp 221-4) o *Rhizomucor* (cfr. Sternberg, 1972, *Biochimica et Biophysica Acta. Protein Structure*, vol. 285(2), pp. 383-92). Estos cuajos contienen proteasas poco específicas que provocan sabores amargos y una  
45 disminución en el rendimiento durante el proceso de elaboración de masas queseras.

Por último, los cuajos recombinantes comercializados se han obtenido, hasta el momento, a partir de microorganismos recombinantes que contienen el gen de la quimosina de *Bos taurus* (cfr. Emtage *et al.*, 1983, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 80(12), pp. 3671-5; Mellor *et al.*, 1983, *Gene*, vol. 24(1), pp 1-14; Cullen *et al.*, 1987, *Bio/Technology*, vol 5(4), pp. 369-76). Esta quimosina recombinante se comporta de la misma manera que la obtenida a partir del prensado directo de cuajares con la ventaja de que su uso evita ahora  
50 la aparición de impurezas o de agentes infecciosos.

Este tipo de quimosinas recombinantes deben ser activadas mediante un proceso de autocatálisis mediado por una simulación del pH ácido del estómago del animal. Solo entonces podrían ser empleadas para la elaboración de queso  
60 (cfr. V B Pedersen *et al.*, 1979, *European journal of biochemistry*, vol. 94(2), pp. 573-80).

**Explicación de la invención**

La presente invención se refiere a la obtención de quimosina de búfalo recombinante activa capaz de coagular leche de distinta procedencia para elaborar masas queseras. Esta quimosina de búfalo, una vez clonada en la levadura  
65 *Pichia pastoris*, es secretada por dicho microorganismo al medio extracelular y en su forma activa. Es decir, sin necesidad de ser activada posteriormente mediante simulación del pH de estómago, lo cual supone una optimización en el procedimiento de elaboración de quesos, con un ahorro de tiempo y dinero a la hora de obtener el producto, aumentando considerablemente el rendimiento en su producción.

Por lo tanto, el uso de esta quimosina recombinante de búfalo, que no es sometida al proceso de activación por pH, supone una ventaja adicional frente al estado de la técnica, al evitar un proceso intermedio de activación para la elaboración de masas queseras.

La quimosina de búfalo muestra características fisicoquímicas más estables que la de *Bos taurus* (cfr. Mohanty *et al*; 2003, *Journal of Dairy Research*, vol. 70(1), pp 37-43; Shindo & Arima; 1979, *Rakuno Kagaku, Shokuhin no Kenkyu*, vol. 28(5), A177-A182) y se ha comprobado que en la elaboración de masas queseras empleando leche de búfala se obtiene un mejor rendimiento si se emplea quimosina de búfalo. Esto resulta interesante para la producción de quesos y, en particular, de queso mozzarella, queso característico originado a partir de leche de búfala.

Otro factor a tener en cuenta es que en la secuencia del gen de la quimosina de *Bos taurus* existe una diana de *EcoRI* que no existe en la secuencia de *Bubalus arnee bubalis*. Esta diferencia puede utilizarse para, por ejemplo, diferenciar una cepa recombinante productora de quimosina de *Bos taurus* de otra productora de quimosina de *Bubalus arnee bubalis*.

Así, un aspecto de la presente invención se refiere al uso del cuajo obtenido directamente a partir de una célula hospedadora en la cual se ha clonado un gen en un vector de expresión, para la coagulación de la leche. En este vector se han clonado las tres formas del gen, que codifican para las proteínas de búfalo seleccionadas de las secuencias de la preproquimosina, la proquimosina y la quimosina. El cuajo así obtenido no requiere una activación previa para llevar a cabo la coagulación de la leche.

Por “leche” entendemos, en la presente invención, el producto obtenido a partir de las hembras de los mamíferos, en particular de los mamíferos domésticos como la vaca, cabra, oveja, yegua, camella, dromedaria, búfala, etc....La coagulación se puede llevar a cabo en los tipos de leche aquí descritos o en cualquiera de sus mezclas.

Entendemos por “cuajo” al producto obtenido por la extracción de los cuajares de rumiantes, en la presente invención de cuajo de búfalo, que sirve para coagular la leche. Este cuajo es el sobrenadante obtenido al clonar la quimosina de búfalo en un microorganismo y secretado al medio extracelular, y comprende un enzima, quimosina recombinante activa de búfalo.

El término “quimosina recombinante activa” significa en esta descripción quimosina recombinante secretada por el organismo hospedador directamente en su forma activa, es decir, sin necesidad de llevar a cabo un proceso intermedio auto-catalítico, mediado por el pH, antes de su uso en la elaboración de queso. Preferiblemente esta quimosina recombinante activa es de búfalo.

El microorganismo hospedador puede ser, pero sin limitarse a levaduras del filo ascomycetes tales como *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Pichia*. En una realización preferida de la presente invención, el microorganismo es *Pichia pastoris*.

Otra realización preferida de la presente invención comprende el uso del cuajo recombinante activo de búfalo para la elaboración de queso. Donde el queso puede ser el obtenido a partir de cualquier tipo de leche o sus mezclas, más preferiblemente para la elaboración de queso a partir de leche de búfalo, denominado mozzarella.

El cuajo, preferiblemente de *Pichia pastoris* recombinante con el gen de la quimosina de búfalo, que contiene el enzima de quimosina, es capaz de elaborar masas queseras más rápidamente que los cuajos recombinantes conocidos en el estado de la técnica y no necesita ningún proceso previo de activación al contrario que los cuajos recombinantes ya conocidos.

A partir de diferentes combinaciones de oligonucleótidos diseñados tanto a partir de la preproquimosina bovina como a partir de la proquimosina de búfalo, se obtienen las secuencias de la preproquimosina, la proquimosina y la quimosina de búfalo. La obtención de estas secuencias de ADN se puede realizar mediante RT-PCR.

Se construye un vector de expresión que contiene las tres secuencias de ADN obtenidas para después ser usado para la expresión de estas secuencias en un microorganismo hospedador, que preferiblemente es *Pichia pastoris*.

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.

### Breve descripción de las figuras

Fig. 1.- Muestra oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de la preproquimosina de *Bos taurus* (NM\_180994) y de la secuencia de la proquimosina de *Bubalus arnee bubalis* (AF177290).

Fig. 2.- Muestra el vector pCR Blunt II TOPO + Preproquimosina.

Fig. 3.- Muestra el vector pCR Blunt II TOPO + Proquimosina.

Fig. 4.- Muestra el vector pCR Blunt II TOPO + Quimosina.

5 Fig. 5.- Muestra el vector de expresión pGAPZ $\alpha$ A.

Fig. 6.- Muestra los ensayos de coagulación de las colonias de *Pichia pastoris* recombinantes.

10 Fig. 7.- Muestra masas queseras realizadas con leche de vaca y cuajo de *Pichia pastoris* recombinante con el gen de la quimosina de búfalo.

### Exposición detallada de modos de realización

15 A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad del uso de quimosina activa recombinante de búfalo.

En los siguientes ejemplos se muestra como a partir del abomaso de un ejemplar de búfalo de agua (*Bubalus arnee bubalis*) lactante se extrajo RNA. Empleando diferentes combinaciones de oligonucleótidos diseñados tanto a partir de la preproquimosina de *Bos taurus* como a partir de la proquimosina de *Bubalus arnee bubalis*, se obtuvieron, mediante RT-PCR, las secuencias de la preproquimosina, la proquimosina y la quimosina de búfalo. Estas mostraron un grado de homología con sus semejantes bovinos de 97.9, 97.1 y 96.8%, respectivamente. Las tres secuencias de ADN obtenidas fueron clonadas en el vector pCR-Blunt II-TOPO para, más tarde, ser transferidas al vector pGAPZ $\alpha$ A. Empleando las construcciones obtenidas a partir de la clonación en el vector integrativo pGAPZ $\alpha$ A se obtuvieron tres clones recombinantes de *Pichia pastoris*. Los tres clones recombinantes de *Pichia pastoris* contenían integrado en su genoma las secuencias correspondientes a la preproquimosina, la proquimosina y la quimosina de *Bubalus arnee bubalis*. Dichos clones recombinantes se cultivaron en medio líquido YPD sin presión selectiva y en los sobrenadantes del cultivo se encontró actividad coagulante de la leche. La levadura *Pichia pastoris* expresó de forma eficaz las tres formas proteicas correspondientes a la preproquimosina, la proquimosina y la quimosina de *Bubalus arnee bubalis* y, además, estas aparecieron en estado ya activo en el sobrenadante del cultivo. El sobrenadante obtenido a partir de *Pichia pastoris* recombinante se sometió a ensayos de coagulación encontrándose, en los tres casos, que dicho cuajo así obtenido fue capaz de coagular diversos tipos de leche originándose masas queseras de gran calidad en un tiempo reducido.

#### Ejemplo

35 Se extrajo el cuajar del estómago de un individuo macho de *Bubalus arnee bubalis* lactante. El tejido se troceó y se sumergió en un estabilizador de RNA; "RNAlater Stabilization Reagent" (Qiagen). Se emplearon 300  $\mu$ l de reactivo por cada 30 mg de muestra de tejido. Este tratamiento evita la degradación del RNA del tejido. A continuación, se procedió a la congelación del tejido empleando N<sub>2</sub> líquido y se mantuvo posteriormente a -80°C un tiempo indefinido. Se aisló el ARN del cuajar empleando el RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Tras la extracción del RNA se procedió a realizar ensayos de RT-PCR para obtener las moléculas de cDNA correspondientes a la preproquimosina, la proquimosina y la quimosina. Para realizar dichos ensayos de RT-PCR se diseñaron tres parejas de oligonucleótidos o cebadores (Fig. 1) a partir de la secuencia de la preproquimosina de *Bos taurus* (NM\_180994) y de la secuencia de la proquimosina de *Bubalus arnee bubalis* (AF177290).

45 Preprochym: 5'- ATG AGG TGT CTC GTG GTG CTA CTT- 3' (SEQ NO: 1)

Prochym: 5'- ATGGCAGAAATCACCAGAATCCCTC- 3' (SEQ NO: 2)

50 Chym: 5'- ATGGGTGAGGTAGCGAGCGTGCC- 3' (SEQ NO: 3)

Chymosin A: 5'- TCAGATAGCCTTCGCCAGCCC -3' (SEQ NO: 4)

55 La primera hebra de cDNA fue sintetizada a 42°C durante una hora realizando varias reacciones empleando distintas combinaciones de los oligonucleótidos; Oligo-p(dT)15, Random p(dN)6 y Chymosin A. El enzima utilizado para la síntesis e la primera hebra fue la AMV reverso transcriptasa (Roche).

Una vez obtenida la primera hebra se procedió a la obtención del cDNA empleando las tres parejas posibles de cebadores anteriormente descritos, mediante PCR. La mezcla de la reacción contenía: tampón de la polimerasa 1X, 0.2 mM de cada oligonucleótido, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de una mezcla de los cuatro desoxinucleótidos, 1 U de Accuzyme DNA Polymerase (Bioline), como molde se usó el producto de la reacción de síntesis de la primera hebra y la mezcla se enrasó con agua hasta 50 microlitros. Esta polimerasa deja extremos romos que son necesarios para la posterior introducción del producto de PCR en el vector de clonación pCR Blunt II TOPO (Invitrogen). La reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador Robocycler 96 (Stratagene) siguiendo un programa de 65 96°C durante 2 min, 35 ciclos de 96°C durante 1 min, 57°C durante 1 min y 72°C durante 2 min y una incubación final a 72°C durante 5 min.

## ES 2 336 171 B1

Los tres productos de PCR obtenidos fueron clonados en el vector pCR BluntII TOPO (Invitrogen). Los fragmentos clonados se secuenciaron. Se encontró una homología entorno al 97% entre las secuencias de *Bos taurus* y de *Bubalus arnee bubalis* y un patrón de digestión con *EcoRI* diferente entre las dos secuencias. Así, se obtuvieron tres construcciones diferentes en el vector pCR Blunt II TOPO que contenían respectivamente las secuencias de la preproquimosina, la proquimosina y la quimosina de búfalo (Figs. 2, 3 y 4).

Para la expresión de las tres secuencias correspondientes a la preproquimosina, la proquimosina y la quimosina en *Pichia pastoris* se utilizó el vector integrativo pGAPZ $\alpha$ A que permite la secreción extracelular del gen una vez clonado en pauta de lectura con la secuencia del péptido señal del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae* y bajo el control del promotor constitutivo pGAP. Además, este vector contiene el terminador del gen AOX y que aporta a la levadura resistencia a zeocina (Fig. 5).

Las secuencias fueron clonadas en el sitio de corte de *EcoRI* del vector pGAPZ $\alpha$ A. Las construcciones obtenidas fueron empleadas para transformar células de *E. coli* TOP10. Los clones de *E. coli* que portaban el vector con la secuencia correctamente orientada con respecto al promotor pGAP se detectaron realizando digestiones del plásmido con el enzima de restricción *KpnI*. Los vectores con los insertos colocados en la orientación adecuada fueron linealizados usando enzima de restricción *BspHI* e introducidos en *Pichia pastoris* mediante electroporación usando un electroporador Genepulser (BioRad) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos lineales se integran en el genoma de *Pichia pastoris* mediante eventos de recombinación. Las colonias de levadura portadoras de las construcciones anteriores fueron seleccionadas en placas de YPD suplementado con zeocina. Las colonias obtenidas tras la selección fueron analizadas por PCR utilizando para ello unos oligonucleótidos diseñados sobre las regiones flanqueantes al punto de inserción en el vector. Una vez obtenidos los clones de *Pichia pastoris* que contenían las secuencias de la preproquimosina, la proquimosina y la quimosina de búfalo, respectivamente, integradas en su genoma, estos se cultivaron en YPD sin presión selectiva (estos es, sin zeocina) durante 100 h a 30°C y 300 rpm. Estos cultivos se centrifugaron obteniéndose sobrenadantes con actividad coagulante de leche sin necesidad de ninguna activación previa. Los ensayos de coagulación (Fig. 6) se realizaron sobre leche en polvo comercial (Central Lechera Asturiana) disuelta al 13% en tampón fosfato potásico 0.01 M, pH 6. Se mezclaron 200  $\mu$ l de sustrato con 200  $\mu$ l de muestra enzimática. Se utilizó como control negativo (C-) el sobrenadante del cultivo de un clon de *Pichia pastoris* con el vector pGAPZ $\alpha$ A sin inserto, como blanco (B) leche disuelta en el tampón (tal como se ha descrito anteriormente) y como control positivo (C+) un cuajo comercial de origen animal.

Como se puede observar en la Fig. 6 se produjo coagulación con casi todos los cultivos. En el control negativo y en el blanco no se produjo coagulación así como sí se produjo coagulación en el control positivo lo que valida el experimento.

Por último, los sobrenadantes de los diferentes clones se emplearon para elaborar masas queseras usando como sustrato leche entera de vaca sin homogenizar. Dichas masas queseras resultaron ser de gran calidad; buen sabor, dureza óptima, buen olor ... etc (Fig. 7).

Para elaborar las masas queseras se empleó el sobrenadante más activo de los clones de *Pichia* recombinantes obtenidos. Resultó que la mejor construcción para la producción de quimosina activa recombinante fue la de la proquimosina en el vector pGAPZ $\alpha$ A.

# ES 2 336 171 B1

## REIVINDICACIONES

5 1. Uso del cuajo obtenido a partir de una célula hospedadora que contiene un vector de expresión que comprende cualquiera de las secuencias que codifican para las proteínas de búfalo seleccionadas del grupo:

a. preproquimosina

b. proquimosina o

10 c. quimosina

para la coagulación de la leche, donde dicho cuajo no requiere una activación previa.

15 2. Uso del cuajo según la reivindicación 1, donde el organismo hospedador es *Pichia Pastoris*.

3. Uso del cuajo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, para la elaboración de queso.

4. Uso del cuajo según la reivindicación 3, para la elaboración de queso mozzarella.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

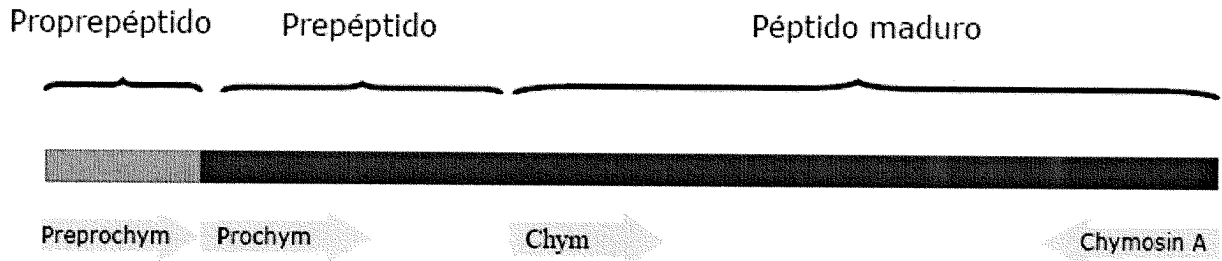


Fig. 1

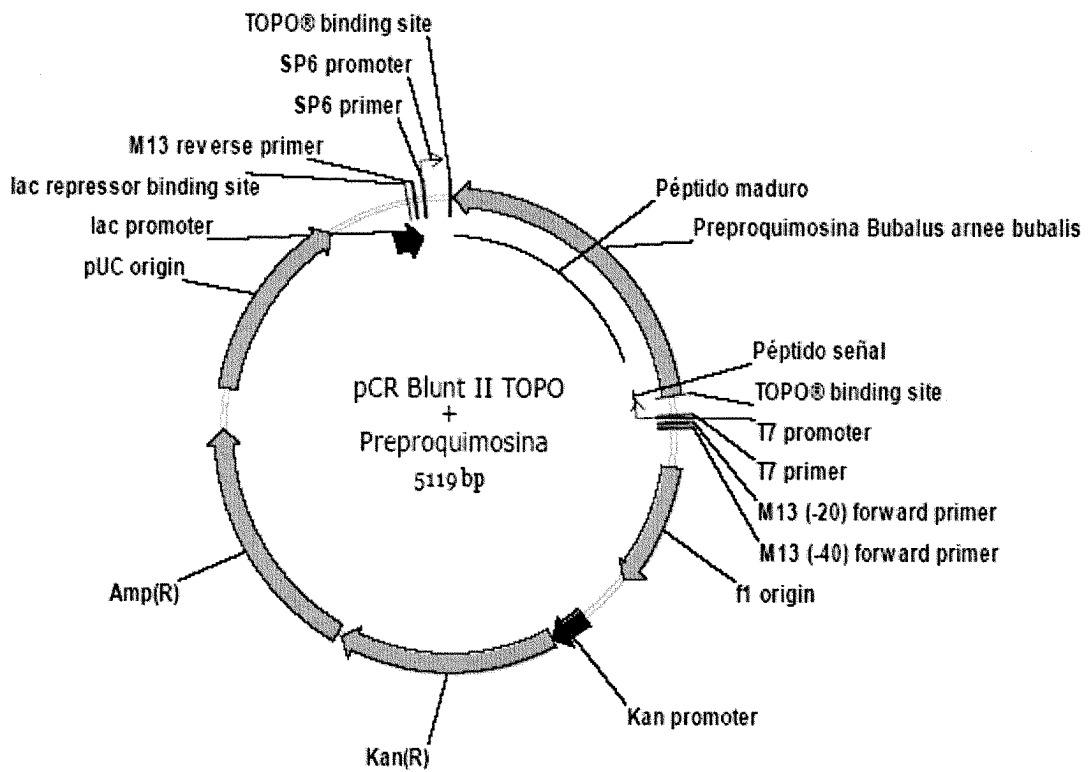
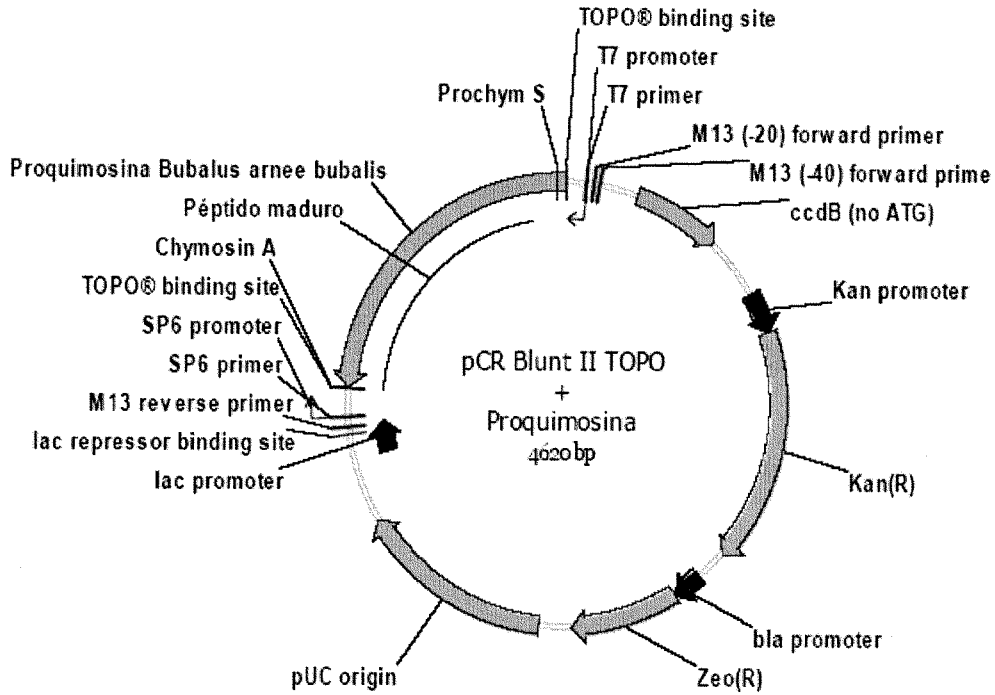
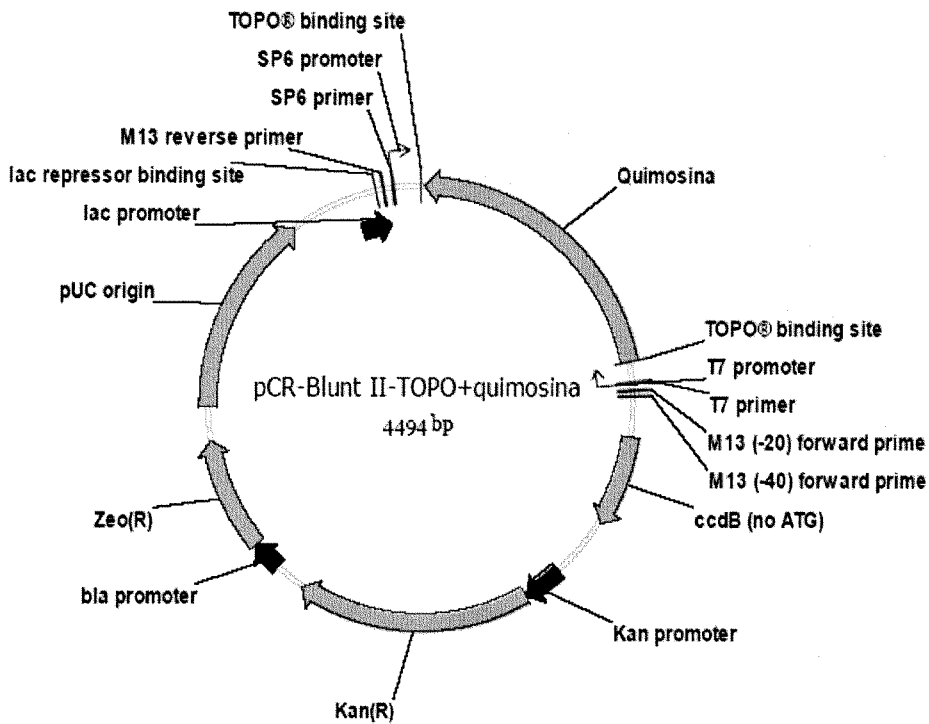


Fig. 2

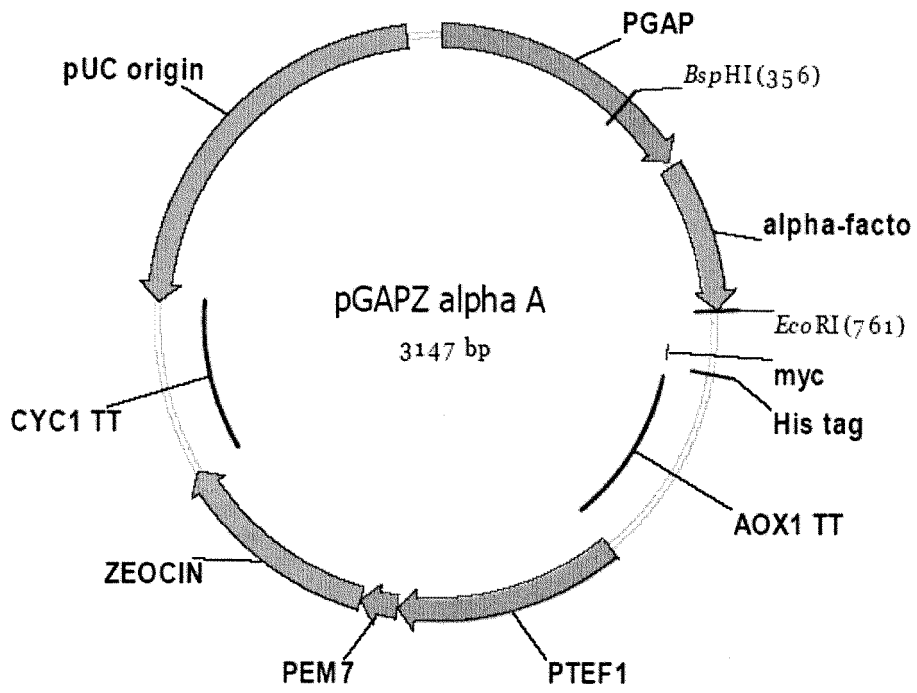


**Fig. 3**



**Fig. 4**

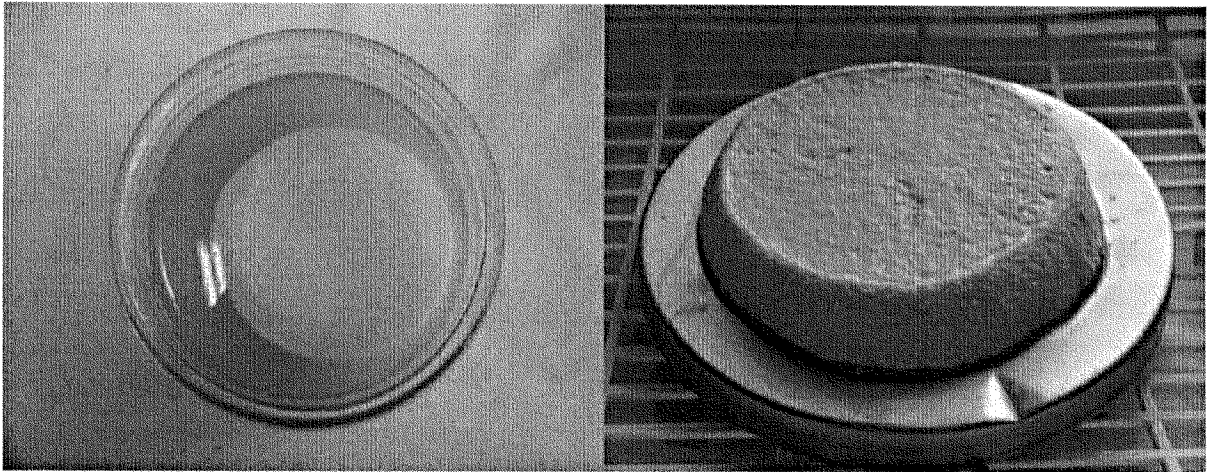




**Fig. 5**



**Fig. 6**



**Fig. 7a**

**Fig. 7b**

# ES 2 336 171 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidade de Santiago de Compostela

5 <120> USO DE LA QUIMOSINA RECOMBINANTE ACTIVA

<130> ES1596.8

10 <160> 4

<170> PatentIn versión 3.4

15 <210> 1

<211> 24

<212> DNA

20 <213> *Bubalus arnee bubalis* lactante

<220>

<221> misc\_feature

25 <222> (1)..(24)

<223> Fragmento de preproquimosina

<400> 1

30 **atgaggtgtc tcgtggtgct actt**

24

<210> 2

35 <211> 25

<212> DNA

<213> *Bubalus arnee bubalis* lactante

40 <220>

<221> misc\_feature

45 <222> (1)..(25)

<223> Proquimosina

<400> 2

50 **atggcagaaa tcaccagaat ccctc**

25

<210> 3

55 <211> 23

<212> DNA

<213> *Bubalus arnee bubalis* lactante

60 <220>

<221> misc\_feature

65 <222> (1)..(23)

<223> Quimosina

# ES 2 336 171 B1

<400> 3  
atgggtgagg tagcgagcgt gcc 23  
5  
<210> 4  
<211> 21  
<212> DNA  
10 <213> *Bubalus arnee bubalis* lactante  
<220>  
15 <221> misc\_feature  
<222> (1)..(21)  
<223> Quimosina A  
20 <400> 4  
tcagatagcc ttcgccagcc c 21  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 336 171

② Nº de solicitud: 200702111

③ Fecha de presentación de la solicitud: 27.07.2007

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	MOHANTY, A. K., MUKHOPADHYAY, U. K., KAUSHIK, J. K. et al. Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo ( <i>Bubalus bubalis</i> ). <i>Journal of Dairy Research</i> . Febrero 2003, Vol. 70, Nº 1, páginas 37-43. ISSN 0022-0299.	1-4
Y	SOSA ESPINOSA, A. E., SOTOLONGO PEÑA, J., MARTÍNEZ SANTANA, V. et al. Comparación de la quimosina bovina secretada al medio de cultivo por cepas recombinantes de las levaduras <i>Pichia pastoris</i> y <i>Kluyveromyces lactis</i> . <i>Biotecnología Aplicada</i> . Julio-Septiembre 1999, Vol. 16, Nº 3, páginas 160-164. ISSN 0684-4551.	1-4
A	ABDEL MALAK, C. A., ABOU EL ADAB, I. F. G., VUKASHINOVIC, V. et al. Buffalo ( <i>Bos buffali</i> L.) chymosin purification and properties. <i>Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry &amp; Molecular Biology</i> . Enero 1996, Vol. 113, Nº páginas 57-62. ISSN 0305-0491.	1,3,4 1,
A	WO 2002036752 A2 (CHR. HANSEN A/S & EIDGENÖSSISCHE TECHNISCHE HOCHSCHULE ZÜRICH) 10.05.2002, todo el documento.	1,3,4

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**

22.03.2010

**Examinador**

E. Relaño Reyes

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N 9/64** (2006.01)

*C12N 15/67* (2006.01)

*C12N 15/81* (2006.01)

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

C12N

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, BIOSIS, EMBASE, XPESP, NPL, MEDLINE, HCAPLUS, AGRICOLA, CABA, FSTA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.03.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-4	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 1-4	<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.

**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	MOHANTY, A. K. et al. Journal of Dairy Research. Febrero 2003, Vol. 70, N° 1, páginas 37-43	02-2003
D02	SOSA ESPINOSA, A. E. et al. Biotecnología Aplicada. Julio-septiembre 1999, Vol. 16, N° 3, páginas 160-164.	1999
D03	ABDEL MALAK, C. A. et al. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology. Enero 1996, Vol. 113, N° 1, páginas 57-62.	01-1996
D04	WO 2002/036752 A2	10-05-2002

## Observaciones sobre documentos:

En D01 se aísla y caracteriza la quimosina de búfalo, *Bubalus bubalis*, también denominado *Bubalus arnee bubalis*. Se destaca la importancia y utilidad de esta enzima en la producción de quesos a partir de leche de búfala.

D02 realiza un estudio comparativo sobre la quimosina bovina expresada en *Pichia pastoris* y *Kluyveromyces lactis*.

En D03 se analizan las características de la quimosina del búfalo doméstico obtenido a partir del cuajo comercial del mismo. Este cuajo se utiliza en la elaboración de quesos de leche de búfala.

D04 anticipa el clonaje de la proquimosina de *Camelus dromedarius* fusionada a la glucoamilasa. Dicha proteína tiene actividad autocatalítica y se convierte en quimosina. En este documento se destaca la importancia de la producción de quimosinas recombinantes de diversas especies (incluido el búfalo) en la producción de quesos realizados a partir de leche de distintos orígenes.

**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**

El objeto de la presente solicitud, es el uso del cuajo sin activación previa, obtenido a partir de *Pichia pastoris* transformada con un vector de expresión que comprende la secuencia que codifica para la preproquimosina, proquimosina o quimosina de búfalo, en la coagulación de la leche (reivindicaciones 1 y 2). Dicho cuajo se utiliza de manera preferente en la elaboración de queso mozzarella (reivindicaciones 3 y 4).

**1. NOVEDAD (Art. 29.6 Ley 11/1986)**

Las reivindicaciones de la 1 a la 4 cumplen con el requisito de novedad.

**2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 29.7 Ley 11/1986)**

El objeto de la presente solicitud de acuerdo con las reivindicaciones de la 1 a la 4, es el uso del cuajo sin activación previa, obtenido a partir de *Pichia pastoris* transformada con un vector de expresión que comprende la secuencia de la preproquimosina, proquimosina o quimosina de búfalo, en la elaboración de queso mozzarella.

D01 se considera el documento más cercano y caracteriza la quimosina de búfalo, resaltando su importancia en la elaboración de quesos, sobre todo los obtenidos a partir de leche de búfala.

La diferencia entre D01 y la presente solicitud, es que en D01 no se apunta la producción de la quimosina mediante el clonaje en *P. pastoris*, sino que se aísla la proteína del tejido de búfalo.

El efecto técnico es una mejora en la producción de la quimosina.

Por lo tanto, el problema a resolver es un método más eficaz de obtención de la quimosina de búfalo.



Hoja adicional

D02 anticipa un estudio comparativo en el que se clona la quimosina bovina en *Kluyveromyces lactis* y *P. pastoris*. En este documento se muestra que la enzima expresada en *P. pastoris* es más semejante a la nativa y se secreta en su manera activa, no necesitando una activación previa a pH=2,5. Esto no sucede con la quimosina producida a partir de *K. lactis*.

Teniendo en cuenta que la secuencia de quimosina de búfalo es ya conocida en el estado de la técnica, tal y como dice la presente solicitud en la página 8, líneas 35-36 y que la quimosina bovina y de búfalo presentan una homología del 97%, un experto en la materia intentaría el uso del cuajo sin activación previa obtenido a partir de *P. pastoris* (D02) trasformada con quimosina de búfalo en la elaboración de queso mozzarella (D01), con una expectativa razonable de éxito.

Cabe resaltar que el clonaje y expresión de una proteína de secuencia conocida mediante la obtención del cDNA, no se considera que implique en sí actividad inventiva, ya que las técnicas y el diseño experimental que hay que emplear para conseguir tal fin son conocidos en el estado de la técnica y se utilizan de manera rutinaria.

En consecuencia, las reivindicaciones de la 1 a la 4 no presentan actividad inventiva.