

①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①1 Número de publicación: **2 376 346**

②1 Número de solicitud: 201031251

⑤1 Int. Cl.:

C12Q 1/18 (2006.01)

C12R 1/45 (2006.01)

①2

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②2 Fecha de presentación: **22.05.2009**

④3 Fecha de publicación de la solicitud: **13.03.2012**

④3 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
13.03.2012

⑥2 Número de la solicitud inicial: **200930199**

⑦1 Solicitante/s: **Universidad de Alicante
Ctra. San Vicente de Raspeig, s/n
03690 Alicante, ES**

⑦2 Inventor/es: **Palma Guerrero, Javier;
López Llorca, Luis Vicente;
López Jiménez, José Ángel;
Jansson, Hans-Börje y
Salinas Calvete, Jesús**

⑦4 Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

⑤4 Título: **Procedimiento para modificar la sensibilidad de los microorganismos a quitosano.**

⑤7 Resumen:

Procedimiento para modificar la sensibilidad de los microorganismos a quitosano.

Método de modificación de la sensibilidad de los microorganismos, preferiblemente hongos, al compuesto quitosano. Este método puede aplicarse a la obtención de hongos más resistentes o más sensibles a este compuesto. El método de modificación de la sensibilidad a quitosano comprende modificar la fluidez de la membrana plasmática del microorganismo, preferiblemente mediante la administración de quitosano en combinación con al menos un compuesto que modifique la fluidez de la membrana plasmática, o mediante la inducción de mutaciones en genes que codifican para enzimas desaturasas de ácidos grasos.

ES 2 376 346 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para modificar la sensibilidad de los microorganismos a quitosano.

5 La presente invención se refiere a un método para modificar la sensibilidad de los hongos al compuesto quitosano. Este método puede aplicarse a la obtención de hongos más resistentes o más sensibles a este compuesto.

Estado de la técnica anterior

10 El quitosano es un polímero formado por subunidades de β -1-4-glucosamina, un derivado parcialmente desacetilado de la quitina, que posee efectos inhibidores del crecimiento de hongos y bacterias, pero no de células de mamífero. Estas propiedades lo convierten en un compuesto antibiótico idóneo para su aplicación en medicina y en la industria alimentaria (Rabea E.I., *et al.*, 2003, *BioMacromolecules* 4, 1458-1465), aunque también es de utilidad para otros fines, como por ejemplo, para la inducción de la esporulación en hongos empleados como agentes del control biológico (WO2008102044 A1); o para controlar las plagas y enfermedades que afectan a plantas de horticultura y agricultura (US005374627 A), entre otros.

20 El quitosano ejerce su actividad antibiótica a través del daño en la membrana plasmática de bacterias y hongos, como *Saccharomyces cerevisiae* y hongos filamentosos (Zakrzewska, A., *et al.*, 2005, *Eukaryotic Cell* 4:4, 703-715). Se ha sugerido que esto ocurre mediante la interacción de los grupos amino con carga positiva del quitosano con las cargas negativas de los fosfolípidos de la membrana plasmática (El Ghaouth, A. and Azul, J., 1992, *Mycological research* 96, 769-773).

25 Las membranas plasmáticas están compuestas principalmente por lípidos, asociados a proteínas y carbohidratos (en forma de glicolípidos y glicoproteínas), y su fluidez depende del tipo de ácidos grasos presentes, en concreto de la longitud de la cadena hidrocarbonada y del grado de insaturación, aunque también del nivel de esteroides y de la naturaleza de otros lípidos constituyentes. En el caso de los hongos, los ácidos grasos son los mismos para todos los hongos, sin embargo, los niveles de cada uno de ellos varía entre las distintas especies.

30 Los perfiles de los ácidos grasos celulares totales (Haack, S.K., *et al.*, 1994, *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2483-2493) se han utilizado normalmente para estimar biomasa microbiana y para obtener información de la diversidad y del estado nutricional de los microorganismos. El potencial del análisis de los ácidos grasos como herramienta taxonómica para hongos también ha recibido especial atención en estudios recientes (Kaur, A., *et al.*, 2005, *Current Science* 89, 1103-1112). Estos estudios han demostrado que la comparación de los ácidos grasos es una medida robusta de similitud a nivel inferior a familia.

35 La sensibilidad de los hongos a quitosano es variable entre los distintos grupos de hongos, siendo más sensibles los hongos fitopatógenos, que los hongos nematófagos y entomopatógenos empleados como agentes de control biológico (Palma-Guerrero, J., *et al.*, 2008, *Journal of Applied Microbiology* 104, 541-553).

40 Diversos trabajos se basan en el estudio del efecto de determinadas mutaciones sobre la sensibilidad a quitosano en la levadura *S. cerevisiae*. Así, la eliminación de genes que codifican proteínas implicadas en el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática así como diferentes formas de estrés de la membrana, conducen a un aumento en la sensibilidad a quitosano. Otros grupos de hongos sensibles a quitosano son aquellos que portan deleciones en genes implicados en la vía de señalización HOG (high-osmolarity glycerol). Se ha demostrado que las células expuestas a condiciones hipertónicas son ligeramente más resistentes a quitosano, mientras que las condiciones hipotónicas sensibilizan a las células frente al mismo. Deleciones en genes implicados en la síntesis y procesamiento de RNA, en la organización del citoesqueleto de actina, en la N-glicosilación de proteínas, en la síntesis de ergosterol, en la endocitosis o en la formación de la pared celular también se han asociado con un aumento en la sensibilidad al compuesto. Por otro lado, el empleo de drogas como la tunicamicina, miconazol y estaurosporina en combinación con el quitosano, provoca asimismo sensibilidad a este compuesto. También la exposición de las células a 37°C, temperatura a la que se cree que aumenta la fluidez de la membrana, induce sensibilidad a quitosano (Zakrzewska, A., *et al.*, 2007, *Eukaryotic Cell* 6:4, 600-608).

55 Pero no sólo se ha tratado de modificar la sensibilidad a quitosano en levaduras. En bacterias *Gram* negativas la deleción de genes que intervienen en la ruta de síntesis del ácido teicoico y lipoteicoico, conlleva un aumento en la resistencia a quitosano, debido a la disminución de las cargas negativas en la pared celular (Raafat, D., *et al.*, 2008, *Applied and Environmental Microbiology* 74:12, 3764-3773).

60 Debido a la variabilidad en la vulnerabilidad de los microorganismos a quitosano y a las múltiples aplicaciones de este compuesto antibiótico, es necesario disponer de un método que permita modificar la sensibilidad de los mismos.

Descripción de la invención

65 La presente invención proporciona un método para modificar la sensibilidad de los hongos al compuesto quitosano.

La susceptibilidad a este compuesto está relacionada con la composición de ácidos grasos de la membrana del hongo, por lo que modificando dicha composición o, en general, la fluidez de la membrana plasmática, es posible alterar dicha susceptibilidad.

La fluidez de la membrana puede variar con la composición química de sus componentes. Así, generalmente, la menor longitud o la mayor cantidad de enlaces insaturados de las cadenas de ácidos grasos, hace que las membranas sean más fluidas. Aunque también existen otros componentes presentes en las membranas que influyen en su fluidez, como pueden ser los esteroides o la naturaleza de otros lípidos constituyentes. La disminución de la temperatura también disminuye la fluidez de la membrana. Por tanto, las células podrían alterar la fluidez de sus membranas modificando su composición química. Por ejemplo, algunas bacterias y hongos son capaces de aumentar la concentración de ácidos grasos insaturados (dobles enlaces) a temperaturas bajas, mientras que cuando suben los cambian por ácidos grasos saturados.

Ya que los componentes determinantes de la fluidez de la membrana plasmática, y en concreto el perfil de ácidos grasos, están directamente relacionados con la sensibilidad de los microorganismos, preferiblemente hongos, a quitosano, es posible modificar dicha sensibilidad alterando la fluidez de la membrana, de manera que aumentado la fluidez aumenta la sensibilidad a quitosano y viceversa. Por tanto, la invención se refiere a un método de modificación de la sensibilidad a quitosano en microorganismos, de ahora en adelante “método de la invención”, que comprende modificar la fluidez de la membrana plasmática del microorganismo.

El quitosano interacciona con la membrana del hongo para ejercer sus efectos inhibitorios sobre el crecimiento, al igual que ocurre en el caso de otros microorganismos, como es el caso de las bacterias. Por ello, mediante la modificación de la fluidez de la membrana de bacterias sería posible modificar la sensibilidad al quitosano, como en el caso de los hongos. En base a esto, aunque los ejemplos de la presente invención pongan de manifiesto la efectividad del método de modificación de la sensibilidad a quitosano en hongos, también podría ser posible aplicarlo a las bacterias. Por ello, en la presente descripción se entiende por “microorganismo” cualquier ser vivo perteneciente al reino *Bacteria* o al reino *Fungi*, es decir, bacterias y hongos, entendiéndose como “hongo” tanto hongos filamentosos (mohos) como hongos levaduriformes (levaduras).

La modificación de la fluidez de la membrana se puede realizar por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante cambios en la temperatura exógena, mediante la administración al microorganismo de formulaciones modificadas del quitosano, o de composiciones que comprendan quitosano y otro/s compuesto/s, capaces de modificar dicha fluidez, como por ejemplo, pero sin limitarnos, el DMSO (dimetil sulfóxido, de fórmula química CH_3SOCH_3) o el Alcohol Bencílico, que rigidizan y fluidizan la membrana respectivamente, o mediante sustancias que aumenten la actividad de las enzimas desaturadas. Otra alternativa es la inducción de mutaciones de sobreexpresión o silenciamiento de genes implicados en las rutas de síntesis de los componentes que determinan la fluidez, como por ejemplo, pero sin limitarnos, genes implicados en la ruta de síntesis de ácidos grasos de la membrana o de los esteroides.

Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, la modificación de la fluidez de la membrana se realiza mediante la administración de quitosano en combinación con al menos un compuesto que modifique la fluidez de la membrana plasmática. En una realización más preferida, el compuesto que modifica la fluidez de la membrana es: DMSO o Alcohol Bencílico. La administración combinada de quitosano con uno de estos compuestos podría realizarse de manera conjunta o secuencial.

En otra realización preferida, la modificación de la fluidez de la membrana se realiza mediante la inducción de mutaciones en genes que codifican para enzimas desaturadas de ácidos grasos. En otra realización preferida el microorganismo es un hongo, en una realización más preferida la enzima desaturada es: oleoil- $\Delta 12$ desaturasa o linoleoil-n3 desaturasa y en una realización aún más preferida la mutación es una delección.

En la presente descripción se entiende por “mutación” cualquier cambio en la secuencia de nucleótidos del ADN, incluyendo, pero sin limitarnos, sustituciones, inserciones o delecciones de bases, inversiones, duplicaciones, adiciones, delecciones, translocaciones, poliploidía, aneuploidía, etc., ya sean de cambio, de pérdida o de ganancia de función génica. Estas modificaciones se pueden llevar a cabo mediante técnicas de ingeniería genética conocidas por cualquier experto en la materia.

Una “enzima desaturasa” es aquella que presenta funciones en la producción de los ácidos grasos insaturados y poliinsaturados y, por tanto, en el mantenimiento de las características funcionales de las membranas y sus componentes. Son enzimas de membrana capaces de introducir un doble enlace entre el grupo carbonilo y una insaturación preexistente en los ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos. La inhibición de la expresión de los genes que codifican para estas enzimas, lo cual puede realizarse mediante la inducción de mutaciones de pérdida de función génica, conduce a una disminución de los ácidos grasos poliinsaturados (a una membrana plasmática menos fluida) y a un aumento en la resistencia a quitosano, como se demuestra en los ejemplos de la presente invención. La sobreexpresión de estos genes conduciría, por tanto, a un aumento en la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (a una membrana plasmática más fluida) y a una mayor sensibilidad a quitosano. En el caso de los hongos existen, pero sin limitarnos, dos enzimas desaturadas: oleoil- $\Delta 12$ desaturasa o linoleoil-n3 desaturasa.

En la presente descripción se entiende por “delección” la mutación que implica, pero sin limitarnos, la pérdida de un fragmento de ADN de un cromosoma, de un gen completo, de un fragmento de un gen o de uno o varios nucleótidos de un gen.

El mutante de *Neurospora crassa* que porta una mutación de delección del gen que codifica para la enzima oleoil- $\Delta 12$ desaturasa empleado en el método de la invención, es conocido por cualquier experto en la materia. Por otro lado,

otro mutante de *Neurospora crassa* porta una mutación de delección del gen, de un fragmento del gen o de uno o varios nucleótidos del gen correspondiente a la enzima linoleoil-n3 desaturasa (GenBank accession number XP_957857, NCU09497.2), mutante que también se puede realizar por métodos conocidos en el estado de la técnica.

5 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

Descripción de las figuras

Fig. 1. Representa el efecto de 1 mg/ml de quitosano sobre el crecimiento de *Neurospora crassa*. Fenotipo silvestre (WT) y dos fenotipos mutantes: *N. crassa* 16054, mutante para la enzima oleoil- Δ 12 desaturasa encargada de producir ácido linoleico (18:2) a partir de ácido oleico (18:1), y *N. crassa* 18505, mutante para la enzima linoleoil-n3 desaturasa encargada de producir ácido linolénico (18:3) a partir de ácido linoleico (18:2). Los asteriscos (**) indican diferencia significativa con el WT.

Ejemplos

20

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto efectividad del método de modificación de la sensibilidad de los hongos al compuesto quitosano. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

25

Ejemplo 1

Efecto del quitosano sobre mutantes para desaturasas de Neurospora crassa

30

Se utilizan mutantes de *N. crassa* para enzimas desaturasas de ácidos grasos, con el fin de corroborar la relación entre los niveles de ácidos grasos insaturados y la sensibilidad a quitosano. En *N. crassa* existen dos enzimas implicadas en la desaturación de ácidos grasos, una enzima es la oleoil- Δ 12 desaturasa, enzima monofuncional encargada de producir ácido linoleico (C18:2) a partir de ácido oleico (C18:1) y la otra enzima es la linoleoil-n3 desaturasa, una enzima n3-desaturasa capaz de producir ácido linolénico (C18:3) a partir de ácido linoleico (C18:2).

35

Los mutantes de *N. crassa* para los dos genes se solicitan al Fungal Genetics Stock Center (Kansas City, Missouri, USA). El mutante para la enzima oleoil- Δ 12 desaturasa está disponible (llamado FGSC16054), el mutante para la linoleoil-n3 desaturasa lo realizaron tras la petición de los inventores (llamado FGSC18505).

40

El quitosano utilizado es el denominado T8s, (Marine BioProducts GMBH, Alemania). Se trata de un quitosano con un peso molecular de 70 KDa, y un grado de desacetilación del 79,6%. Para utilizar experimentalmente el quitosano, previamente debe disolverse. Para ello, el quitosano en polvo se disuelve con Ácido Clorhídrico 0,25 M y se ajusta el pH a 5,6 con Hidróxido de Sodio 1 M. La disolución de quitosano se somete a diálisis en agua destilada a 4°C, con dos cambios al día, a lo largo de tres días, para eliminar las sales presentes en el quitosano, o formadas al ajustar el pH de la disolución en HCl a 5,6 con NaOH (Benhamou, N., *et al.*, 1994, *Phytopathology* 84, 1432-1444). Tras la diálisis se comprueba que el pH del quitosano se mantiene estable a 5,6. Finalmente, el quitosano disuelto se somete a esterilización mediante vapor húmedo en autoclave.

45

El medio de cultivo suplementado con quitosano se realiza preparando el medio de cultivo PDA (agar dextrosa patata, Oxoid). Una vez esterilizado con vapor húmedo en autoclave (20 minutos a 120°C), se añade el volumen de quitosano necesario para obtener la concentración de quitosano 1 mg/ml. Por último, se dispensa el medio de cultivo en placas Petri de plástico estériles de 9 cm de diámetro. Como control se utilizan placas conteniendo PDA sin quitosano.

50

Las placas con el medio descrito se inoculan en el centro con discos de 5 mm tomados del borde de colonias de los hongos creciendo activamente (de 2 días para los 3 hongos) en medio CMA, y se incuban a 25°C con luz. Se realizan tres réplicas por tratamiento.

55

Pasadas 10 horas se toman las medidas de crecimiento radial, se calculan los porcentajes de crecimiento de los hongos en medio con quitosano respecto al medio control, y se comparan los hongos mutantes con el silvestre (véase Figura 1).

60

En la figura 1 se puede observar que el mutante para la enzima oleoil- Δ 12 desaturasa (16054) muestra inhibición por el quitosano significativamente menor que el silvestre (WT), mientras que el mutante para la enzima linoleoil-n3 desaturasa (18505) muestra la misma sensibilidad a quitosano que el control.

65

Para confirmar que el cambio de sensibilidad en los mutantes es debido a una disminución en los ácidos grasos poliinsaturados, se miden los niveles de ácidos grasos de ambos mutantes. Para ello, tras homogeneizar los micelios

ES 2 376 346 A1

individualmente, se determina la composición de ácidos grasos de la fracción lipídica total por extracción de grasa siguiendo el método de Folch (Folch *et al.*, 1957, *Journal of Biological Chemistry* 226, 497-509), con una mezcla de cloroformo y metanol (Sigma, St. Louis, Mo, USA) en proporciones 1:1 y 2:1 para la primera y la segunda extracción respectivamente. Las muestras se analizan siguiendo el método de Stoffel (Stoffel *et al.*, 1959, *Anal Chemistry* 31, 307-308) por cromatografía gas-líquido usando una columna de capilaridad de sílica fusionada flexible SP™ 2560 (100 mm de longitud, 0,25 mm de diámetro interno, y película de 0,2 µm de grosor) en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 (Waldbronn, Alemania). La temperatura del horno se programa a 140°C durante 5 minutos, con un ratio de subida de 4°C por minuto hasta 230°C, seguido de un ratio de 1°C por minuto hasta 240°C, la cual se mantiene por 6 minutos. El inyector y el detector de ionización se establecen a 250°C. Se usa helio como gas conductor a una presión de 290 Kpa, y se identifican los picos por comparación de sus tiempos de retención con estándares comprados en Sigma (St. Louis, Mo, USA).

Las concentraciones de los ácidos grasos se calculan en porcentaje respecto al contenido total. El “índice de insaturación” de cada muestra se calcula multiplicando el porcentaje de cada ácido graso (respecto a todos los ácidos grasos presentes en la muestra) por el número de dobles enlaces en él y sumando los resultados para todos los ácidos grasos identificados en la muestra. El resultado obtenido se muestra en la siguiente tabla, donde sólo se representan los valores obtenidos para los ácidos grasos mayoritarios, pero los porcentajes tienen en cuenta todos los ácidos grasos observados en la muestra. El resultado de los perfiles de ácidos grasos de *N. crassa* silvestre y de los dos mutantes puede observarse en la tabla 1.

Tabla 1. Perfiles de ácidos grasos de *N. crassa* silvestre (WT) y de los mutantes 16054 y 18505. Porcentajes ± Desviación Estándar. Distinto superíndice indica diferencia significativa ($p < 0,05$) entre hongos para cada ácido graso.

Como se puede observar en la tabla 1, el mutante 16054, en el cual se ha delecionado el gen para la oleoil-Δ12 desaturasa, no produce ácido linoleico (C18:2), y por tanto tampoco se produce ácido linolénico (C18:3), y se acumula gran cantidad de ácido oleico (C18:1), mostrando un índice de insaturación de $89 \pm 1,2$, mientras que en el WT es de $148 \pm 0,7$. El mutante 18505, en el que se ha delecionado la enzima linoleoil-n3 desaturasa, no muestra ácido linolénico, pero muestra mayores niveles de ácido linoleico (C18:2), y por tanto un índice de insaturación ($133 \pm 1,9$) mayor que el mutante 16054, lo cual explica que su sensibilidad no sea significativamente diferente al WT.

De acuerdo con estos resultados, el aumento de resistencia a quitosano en el mutante 16054 es debido a la disminución de ácidos grasos poliinsaturados. Quedando así demostrado que se puede modificar la sensibilidad de los hongos a quitosano modificando la fluidez de la membrana plasmática.

Ácido graso	WT	16054	18505
Ác. palmítico (C16:0)	18.45 ± 0.19^a	11.91 ± 0.23^b	21.48 ± 0.46^c
Ác. esteárico (C18:0)	3.52 ± 0.03^a	0.83 ± 1.43^a	3.00 ± 0.20^a
Ác. oleico (C18:1 n-9)	12.15 ± 0.37^a	81.63 ± 0.64^b	9.72 ± 0.19^c
Ác. linoleico (C18:2 n-6)	47.29 ± 0.20^a	0.16 ± 0.08^b	58.38 ± 1.25^c
Ác. linolénico (C18:3 n-3)	10.58 ± 0.22^a	0.55 ± 0.01^b	0.05 ± 0.03^c

REIVINDICACIONES

5 1. Método de modificación de la sensibilidad a quitosano en microorganismos que comprende modificar la fluidez de la membrana plasmática del microorganismo mediante la inducción de mutaciones en genes que codifican para enzimas desaturadas de ácidos grasos.

10 2. Método de modificación de la sensibilidad a quitosano según la reivindicación 1, donde el microorganismo es un hongo.

3. Método de modificación de la sensibilidad a quitosano en microorganismos según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la enzima desaturada es: oleoil- Δ 12 desaturada o linoleoil-n3 desaturada.

15 4. Método de modificación de la sensibilidad a quitosano en microorganismos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la mutación es una delección.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Efecto quitosano en crecimiento

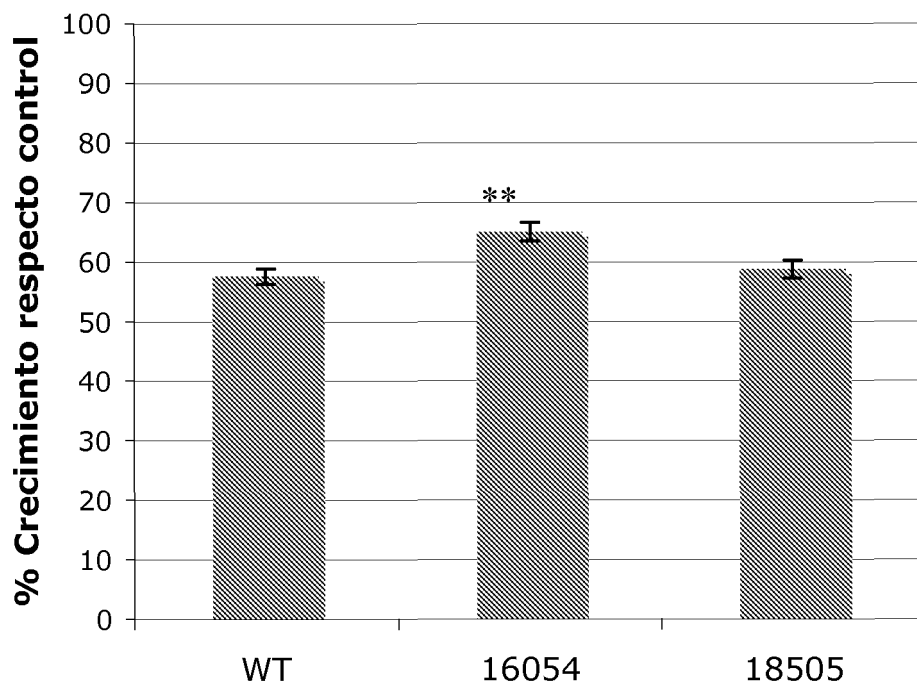


Fig. 1



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201031251

②² Fecha de presentación de la solicitud: 12.08.2010

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12Q1/18** (2006.01)
C12R1/45 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	RU 2232504 C1 (PLANT PROTECTION RES INST) 20.07.2004, (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [recuperado el 13.08.2010]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW 200456, N° DE ACCESO 2004-578240.	1-4
A	WO 0059949 A1 (BEN-SHALOM, N. et al.) 12.10.2000, todo el documento.	1-4
A	PALMA-GUERRERO, J. et al.: "Chitosan Permeabilizes the Plasma Membrane and Kills Cells of Neurospora crassa in an Energy Dependent Manner", Fungal Genetics and Biology (21.04.2009) vol. 46, pp.: 585-594; todo el documento.	1-4
A	HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N. et al.: "Antifungal Effects of Chitosan with Different Molecular Weights on in vitro Development of Rhizopus stolonifer (Ehrenb.: Fr.) Vuill", Carbohydrate Polymers (2008), vol. 73, pp.: 541-547; todo el documento.	1-4
A	BAUTISTA-BAÑOS, S. et al.: "Growth Inhibition of Selected Fungi by Chitosan and Plant Extracts", Revista Mexicana de Fitopatología (2004), vol. 22 (2) pp.: 178-186; todo el documento.	1-4
A	BAUTISTA-BAÑOS, S. et al.: "Chitosan as a Potential Natural Compound to Control Pre and Postharvest Diseases of Horticultural Commodities", Crop Protection (2006), vol. 25, pp.: 108-118; todo el documento.	1-4

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
30.01.2012

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/4

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

C12Q, 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, BIOSIS, CA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.01.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-4	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-4	SI
	Reivindicaciones	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 se publica.

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	RU 2232504 C1 (PLANT PROTECTION RES INST) 20.07.2004, (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [recuperado el 13.08.2010]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW 200456, N° DE ACCESO 2004-578240.	
D02	WO 0059949 A1 (BEN-SHALOM, N. et al.)	12.10.2000
D03	PALMA-GUERRERO, J. et al.: "Chitosan Permeabilizes the Plasma Membrane and Kills Cells of Neurospora crassa in an Energy Dependent Manner", Fungal Genetics and Biology (21.04.2009) vol. 46, pp.: 585-594; todo el documento.	
D04	HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N. et al.: "Antifungal Effects of Chitosan with Different Molecular Weights on in vitro Development of Rhizopus stolonifer (Ehrenb.: Fr.) Vuill", Carbohydrate Polymers (2008), vol. 73, pp.: 541-547; todo el documento.	
D05	BAUTISTA-BANOS, S. et al.: "Growth Inhibition of Selected Fungi by Chitosan and Plant Extracts", Revista Mexicana de Fitopatología (2004), vol. 22 (2) pp.: 178-186; todo el documento.	
D06	BAUTISTA-BANOS, S. et al.: "Chitosan as a Potential Natural Compound to Control Pre and Postharvest Diseases of Horticultural Commodities", Crop Protection (2006), vol. 25, pp.: 108-118; todo el documento.	

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 solicitud reivindica un método para modificar la sensibilidad a quitosano en microorganismos. Para ello propone un mecanismo molecular que actuaría sobre la fluidez de la membrana y, por ende, sobre la sensibilidad al quitosano. Consiste en provocar mutaciones en el microorganismo sobre el que va a actuar el quitosano a nivel de los genes que codifican para una desaturasa (implicada en la síntesis de ácidos grasos) afectando así a la composición de ácidos grasos de la membrana y así, a la fluidez y a la sensibilidad a quitosano.

D01-D06 tan solo reflejan el estado de la técnica anterior y no revelan información que pueda considerarse particularmente relevante para el contenido de las reivindicaciones de la solicitud. Por otro lado, no se considera que a partir de dicha información contenida en D01-D06 un experto en la materia podría llegar fácilmente al objeto de la invención reivindicado en la solicitud.

Por todo ello, se considera que las reivindicaciones 1-4 de la presente solicitud cumplen el requisito de novedad en el sentido del artículo 6.1 de la Ley 11/1986 y el de actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 de la Ley 11/1986.