

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 334**

21 Número de solicitud: 201131065

51 Int. Cl.:

C12N 1/16 (2006.01)
C07K 14/39 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

24.06.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

06.03.2013

Fecha de la concesión:

30.05.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

06.06.2014

73 Titular/es:

QUEIZÚAR, S.L. (100.0%)
A Silva - Bama, s/n
15822 Touro (A Coruña) ES

72 Inventor/es:

PEREIRA RODRÍGUEZ, Ángel;
BECERRA FERNÁNDEZ, Manuel;
GONZÁLEZ SISO, M^a Isabel y
CEDRÁN VILLANUEVA, M^a Esperanza

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **CEPA DE LEVADURA KLUYVEROMYCES LACTIS Y PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE AZÚCARES, ETANOL, β -GALACTOSIDASA Y BIOMASA.**

57 Resumen:

La presente invención es una cepa de levadura *Kluyveromyces lactis* que comprende la secuencia identificada por SEQ ID NO: 1 y procedimientos de obtención de azúcares (glucosa y galactosa), etanol, β -galactosidasa y biomasa en los que se cultiva dicha cepa de levadura *Kluyveromyces lactis* en presencia de un medio que comprende lactosa. El medio que comprende lactosa puede ser leche, suero lácteo, suero resultante de la preparación de mantequilla, suero resultante después de la precipitación de la caseína, permeado de leche, permeado de suero, suero ácido y medio de cultivo YPL.

ES 2 397 334 B1

DESCRIPCIÓN

Cepa de levadura *Kluyveromyces lactis* y procedimientos de obtención de azúcares, etanol, β -galactosidasa y biomasa

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una cepa de levadura *Kluyveromyces lactis* modificada mediante integración genómica capaz de secretar β -galactosidasa al medio. Dicha cepa de levadura se utiliza en procedimientos de obtención de azúcares, biomasa, etanol y β -galactosidasa en medios que comprenden lactosa, como leche o suero lácteo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El suero de leche es el líquido remanente tras la precipitación y separación de la caseína de la leche durante la elaboración del queso. Este suero de leche retiene el 55% de los nutrientes de la leche (es el 85-90% del volumen de la leche) y tiene una alta demanda biológica y química de oxígeno de manera que es considerado un subproducto contaminante, y un problema medioambiental importante para las queserías.

Hasta el momento no se ha desarrollado ninguna tecnología que haya demostrado ser suficientemente rentable para el procesado de grandes volúmenes de suero. El principal inconveniente es el reducido número de microorganismos capaces de crecer en el suero de leche. Las cepas silvestres de levaduras respiradoras, como es el caso de *Kluyveromyces lactis*, no logran conseguir concentraciones de alcohol suficientes para rentabilizar la inversión

El problema que plantea la técnica es proporcionar una cepa de *Kluyveromyces lactis* capaz de secretar β -galactosidasa al medio en forma nativa y activa y capaz de conseguir concentraciones de alcohol mayores que la cepa silvestre. La solución que propone la presente invención es una cepa de levadura *Kluyveromyces lactis* depositada en la Colección de Cultivos Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con el número de depósito DSM 24900, que comprende la secuencia identificada por SEQ ID NO: 1.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención es una cepa de levadura *Kluyveromyces lactis* depositada en la Colección de Cultivos Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con el número de depósito DSM 24900, que comprende la secuencia identificada por SEQ ID NO: 1.

La cepa de levadura *Kluyveromyces lactis* de la invención, se depositó el 06/06/2011 en la Colección de Cultivos Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig (Alemania), por el depositante Queizúar, SL, A Silva-Bama, s/n, 15822 Touro, A Coruña (España).

La cepa de levadura *Kluyveromyces lactis* recibió el número de depósito DSM 24900 después de que la Autoridad Internacional de Depósito declarase que la cepa era viable.

La cepa de la invención comprende una construcción de ADN identificada por la SEQ ID NO: 1, que comprende la secuencia señal del preprofactor α de *Kluyveromyces lactis* fusionada en la misma pauta de lectura con la forma madura de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*. La secuencia señal del preprofactor α de *Kluyveromyces lactis* es capaz de promover la secreción de la β -galactosidasa de la cepa de la invención. Se ha encontrado sorprendentemente que la cepa de levadura que contiene dicha construcción, aunque tiene unos niveles de crecimiento inferiores a los de la cepa nativa, secreta β -galactosidasa al medio en su forma activa con rendimientos hasta 113% superiores a la misma cepa *K. lactis* sin modificar. La cepa se puede utilizar para la producción de azúcares, biomasa, etanol y β -galactosidasa a partir de un medio de cultivo rico en lactosa.

La construcción identificada por la secuencia SEQ ID NO: 1 comprende también la secuencia que codifica para el péptido FLAG, reconocida por un anticuerpo monoclonal y que puede servir para reconocer la proteína de fusión resultante por cromatografía de inmunoafinidad. Dicha secuencia puede ser sustituida por secuencias que codifican para péptidos etiqueta que cumplen una función equivalente como tales como, c-myc, HA, E. También puede ser sustituida por secuencias peptídicas que permitan el aislamiento o purificación del péptido o proteína de fusión, por ejemplo, una secuencia de polihistidina.

Preferiblemente, el péptido etiqueta es el epítipo FLAG, y se encuentra conectado al extremo C-terminal de la β -galactosidasa.

Una realización es una cepa de la invención que comprende además las secuencias identificadas por SEQ ID NO: 3, 4 y 5.

Dicha cepa comprende un promotor para la expresión de la proteína. Dicho promotor es el promotor del gen LAC4, que está identificado por las secuencias SEQ ID NO: 3 y 4. Dicha cepa comprende también un terminador transcripcional. Dicho terminador transcripcional es el terminador del gen LAC4, que está identificado por la secuencia SEQ ID NO: 5.

Otra realización es una cepa de la invención que comprende una secuencia que tiene una identidad del 95% respecto a SEQ ID NO: 1. Y otra realización es que dicha identidad sea del 90%.

5 En la presente solicitud, dicho porcentaje de identidad en una secuencia determinada se calcula teniendo en cuenta que un 95% de identidad significa que un 95% de residuos de la secuencia completa de la construcción de ADN identificada por la secuencia SEQ ID NO: 1 son idénticos a los residuos de la secuencia determinada.

10 Una realización preferible es una proteína obtenida de la cepa de la invención, cuya secuencia de aminoácidos está identificada por la secuencia SEQ ID NO: 2.

Otra realización es un vector que comprende las secuencias identificadas por SEQ ID NO: 1, 3, 4 y 5.

15 Dicho vector se utiliza para introducir dichas secuencias en la cepa de la invención. Existen distintos métodos adecuados para introducir una molécula de ADN en la cepa de la invención:

- Transformación de esferoplastos, lo que implica eliminar la pared celular de la levadura y poner en contacto las esferoplastos con el plásmido en presencia de PEG.

20 - Transformación con Li⁺, que implica el tratamiento de células de levadura con cationes alcalinos monovalentes (Na⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺ y Li⁺) en combinación con PEG para estimular la captación del ADN por las células intactas.

- Electroporación, que implica la administración de pulsos eléctricos a las levaduras lo que resulta en la apertura de poros en la membrana de esferoplastos y de células de levadura intactas.

25 Las cepas de la invención son capaces de crecer en un medio rico en lactosa, que es degradada y forma glucosa y galactosa. De forma que una realización de la invención es un procedimiento de obtención de azúcares, en que se cultiva una cepa de levadura *Kluyveromyces lactis* que comprende la secuencia identificada por SEQ ID NO: 1 en presencia de un medio que comprende lactosa. Una realización preferible es el procedimiento de obtención de azúcares de la invención en que dicho medio que comprende lactosa está seleccionado entre el grupo compuesto por leche, suero lácteo, suero resultante de la preparación de mantequilla, suero resultante después de la precipitación de la caseína, permeado de leche, permeado de suero, suero ácido y medio de cultivo YPL.

30 Una realización preferible es un procedimiento de obtención de azúcares de la invención, en que dichos azúcares son glucosa y/o galactosa.

35 Otra realización preferible es un procedimiento de obtención de azúcares de la invención, en que dicha cepa de levadura comprende una secuencia que tiene una identidad del 95% respecto a SEQ ID NO: 1. En otra realización más preferible, dicha identidad es del 90%.

40 En el procedimiento de obtención de azúcares se fuerza la respiración celular de la cepa de la invención mediante una agitación y aireación altas, evitando de esta manera las pérdidas de rendimiento por fermentación de parte de los azúcares a etanol.

45 Los medios que comprenden lactosa que pueden ser utilizados como fuente de carbono en el contexto de la presente invención incluyen tanto medios sintéticos como productos naturales y sus derivados. Medios sintéticos o semi-sintéticos que pueden ser usados en el contexto de la presente invención incluyen YPL; que contiene 1% extracto de levadura, 2% de bactopectona y una cantidad de lactosa que varía entre el 0,5% y el 6%.

50 Productos naturales ricos en lactosa que se pueden usar como medio de cultivo para la cepa de la invención incluyen la leche y derivados de la misma, tales como, leche desnatada, el suero resultante de la preparación de mantequilla (*buttermilk*), el suero resultante después de la precipitación de la caseína o el permeado de un producto lácteo, que puede ser un permeado de leche o un permeado de suero. La presente invención contempla el uso de leche de prácticamente cualquier origen, incluyendo, sin estar limitado, la leche de vaca, humana, de cabra, de oveja, de camello, de búfala y similares. Preferiblemente, la leche es sometida a tratamiento con cuajo de origen animal (extracto obtenido del cuajar del estómago de rumiantes), de origen vegetal o recombinante y a temperaturas de entre 30 y 40°C, lo que da lugar a la coagulación de la caseína de la leche, que arrastra la mayor parte de la fracción grasa de la misma. Tras la eliminación del coágulo, se obtiene el suero, que puede ser usado tal cual (el llamado "suero dulce") o puede ser sometido a un proceso de desproteínización adicional, por ejemplo, mediante ultrafiltración u otras técnicas de separación basadas en membranas porosas con un límite de separación de 17-20 kDa. Asimismo, la invención contempla el uso del llamado suero ácido, resultante de la precipitación de las proteínas de la leche en medio ácido.

65 El suero de la leche puede ser concentrado mediante pulverización en aerosol para dar lugar a fracciones con un mayor contenido en materia sólida seca que el suero original, incluyendo un producto sólido denominado permeado de suero. Contenidos típicos en materia sólida seca varían desde un 5 a 6% en el suero, pasando por valores superiores a 30%, en particular, entre 50 y 60% de los concentrados. La concentración de lactosa varía entre 70 y 75% del total de materia sólida seca en el caso del suero dulce y llega hasta valores de entre 82 y 86% en el caso de los permeados de suero.

- 5 La glucosa y galactosa que se forman como resultado de la hidrólisis de la lactosa se pueden recuperar del medio de cultivo usando técnicas ampliamente conocidas por el experto en la materia. Preferiblemente, la glucosa y galactosa se purifican mediante adsorción con preparaciones de carbón activo con distintas propiedades o usando membranas de cerámica.
- 10 La lactosa del medio de cultivo es digerida por las cepas de la invención para dar glucosa y galactosa que, a su vez, son sustratos adecuados para la fermentación alcohólica produciéndose alcoholes. De forma que una realización de la invención es un procedimiento de obtención de etanol en que se cultiva una cepa de levadura *Kluyveromyces lactis* que comprende la secuencia identificada por SEQ ID NO: 1 en presencia de un medio que comprende lactosa.
- 15 Una realización preferible es un procedimiento de obtención de etanol de la invención, en que dicho medio que comprende lactosa está seleccionado entre el grupo compuesto por leche, suero lácteo, suero resultante de la preparación de mantequilla, suero resultante después de la precipitación de la caseína, permeado de leche, permeado de suero, suero ácido y medio de cultivo YPL.
- 20 Otra realización preferible es un procedimiento de obtención de etanol de la invención, en que dicha cepa de levadura comprende una secuencia que tiene una identidad del 95% respecto a SEQ ID NO: 1. En otra realización más preferible, dicha identidad es del 90%.
- 25 El etanol puede ser usado como combustible, en bebidas o a nivel industrial. Normalmente, la fermentación alcohólica para producir etanol se lleva a cabo durante 30-60 horas, a una temperatura en torno a 32°C. El etanol se recupera del medio usando técnicas convencionales, como la destilación.
- 30 La cepa de la invención es capaz de producir y secretar al medio β -galactosidasa. De forma que una realización preferible de la invención es un procedimiento de obtención de la proteína identificada por la secuencia SEQ ID NO: 2, en que se cultiva una cepa de levadura *Kluyveromyces lactis* que comprende la secuencia identificada por SEQ ID NO: 1 en presencia de un medio que comprende lactosa.
- 35 Una realización preferible es un procedimiento de obtención de la proteína identificada por la secuencia SEQ ID NO: 2 de la invención, en que dicho medio que comprende lactosa está seleccionado entre el grupo compuesto por leche, suero lácteo, suero resultante de la preparación de mantequilla, suero resultante después de la precipitación de la caseína, permeado de leche, permeado de suero, suero ácido y medio de cultivo YPL.
- 40 Otra realización preferible es un procedimiento de obtención de la proteína identificada por la secuencia SEQ ID NO: 2 de la invención, en que dicha cepa de levadura comprende una secuencia que tiene una identidad del 95% respecto a SEQ ID NO: 1. En otra realización más preferible, dicha identidad es del 90%.
- 45 La proteína β -galactosidasa se puede purificar convenientemente en un único paso de cromatografía de afinidad, usando análogos de sustrato, tal como, p-aminofenil- β -D-tiogalactopiranosido.
- 50 La purificación de β -galactosidasa de *K. lactis* y sus variantes se puede realizar usando métodos conocidos en la técnica. La determinación del grado de pureza de la β -galactosidasa se puede estimar mediante el valor de la actividad enzimática específica que se calcula dividiendo el número de unidades de actividad enzimática entre la cantidad de mg de proteína en un volumen determinado. Preferiblemente, la actividad enzimática se determina mediante el método de Guarente (Guarente, L., 1983, Methods in Enzymology, 101: 181-191).
- 55 Una realización preferible de la invención es un procedimiento de obtención de biomasa, en que se cultiva una cepa de levadura *Kluyveromyces lactis* que comprende la secuencia identificada por SEQ ID NO: 1 en presencia de un medio que comprende lactosa.
- 60 Una realización preferible es un procedimiento de obtención de biomasa de la invención, en que dicho medio que comprende lactosa está seleccionado entre el grupo compuesto por leche, suero lácteo, suero resultante de la preparación de mantequilla, suero resultante después de la precipitación de la caseína, permeado de leche, permeado de suero, suero ácido y medio de cultivo YPL.
- 65 Otra realización preferible es un procedimiento de obtención de biomasa de la invención, en que dicha cepa de levadura comprende una secuencia que tiene una identidad del 95% respecto a SEQ ID NO: 1. En otra realización más preferible, dicha identidad es del 90%.
- La biomasa se puede recuperar del medio de cultivo mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia incluyendo, sin estar limitado, centrifugación, depósito o filtración. Preferiblemente, la técnica empleada debe minimizar al máximo el daño a las células. En caso de que el mismo cultivo se use para la preparación de biomasa y de etanol, la separación de la biomasa de células de levaduras debe minimizar al máximo la pérdida de etanol.

Normalmente, la levadura recuperada del medio de cultivo se lava con una solución acuosa para eliminar materiales indeseados que pudiesen estar asociados a la levadura. Preferiblemente, el contenido de proteína en la levadura es de entre 35 y 65%.

5 La biomasa de levadura recuperada se puede utilizar como ingrediente en productos alimenticios sin necesidad de procesamiento adicional. La biomasa recuperada también se puede lisar y, opcionalmente, separar las células intactas. Las células de levadura lisadas pueden ser usadas en medios de cultivo como extracto de levadura o pueden ser procesadas adicionalmente para separar sus distintos componentes, tales como péptidos, nucleótidos, aminoácidos o componentes específicos de la pared celular tales como quitina, glucanos, mananos y oligosacáridos.

10

TEXTO LIBRE DE LA LISTA DE SECUENCIAS

A continuación se aporta una traducción al español del texto libre que aparece en la lista de secuencias.

15

SEQ ID NO: 1. Dominio de secreción del preprofactor α de *Kluyveromyces lactis*, β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* y péptido FLAG.

SEQ ID NO: 3. Región 1 del promotor de β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*.

SEQ ID NO: 4. Región 2 del promotor de β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*.

SEQ ID NO: 5. Terminador de β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Crecimiento y producción de etanol de la cepa de *Kluyveromyces lactis* en suero de leche. Panel superior, crecimiento y rendimiento en gramos de etanol por gramo de células de la cepa *Kluyveromyces lactis* silvestre. Panel inferior, crecimiento y rendimiento en gramos de etanol por gramo de células de la cepa *Kluyveromyces lactis* de la invención.

25

Figura 2: Crecimiento, consumo de lactosa y producción de etanol de la cepa *Kluyveromyces lactis* de la invención en suero de leche en un fermentador a 30° C.

30

Figura 3: Crecimiento, actividad β -galactosidasa intracelular y extracelular de la cepa *Kluyveromyces lactis* de la invención creciendo en un medio rico en lactosa en medio de cultivo YPL 5% (1% extracto de levadura, 0.5% bactopectona y 5% de lactosa) en matraces a 30°C y 150 rpm de agitación.

Figura 4. Muestra una representación esquemática de la estructura del vector que comprende la SEQ ID NO: 1.

35

MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE

Ejemplo 1. Construcción del vector y transformación de la cepa de la invención

A partir de la secuencia LAC4 que codifica para la β -galactosidasa de *K. lactis* se diseñaron unos oligonucleótidos cebadores con el fin de amplificar el gen mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) junto con el péptido FLAG y posteriormente ligarlo a un vector de expresión de levaduras obteniendo el plásmido correspondiente.

40

El vector contiene el promotor de la β -galactosidasa de *K. lactis* que es inducido bajo la presencia de galactosa y/o lactosa, una secuencia que codifica la secuencia señal del preprofactor α de levaduras, y el terminador de la β -galactosidasa de *K. lactis*. La estructura del vector está representada en la figura 4.

45

El gen se integra en la levadura en el locus del LAC4 mediante recombinación homóloga. En el caso de esta cepa se integraron varias copias en tándem del gen en el genoma de la levadura.

50

Con las construcciones resultantes se transformó la cepa de levadura usando el método del acetato de litio de Ito et al. (Ito et al., 1983, J. Bacteriol., 153: 163-168).

Ejemplo 2. Medios y condiciones de cultivo de la cepa de la invención

Con la cepa recombinante obtenida, se realizaron cultivos en medios ricos en galactosa y/o lactosa, así como en otras fuentes de carbono (glucosa, glicerol, etc), en matraces de diferentes volúmenes (50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 mL), intentando mantener una relación de 1/2,5 respecto al líquido en el volumen del matraz. También se realizaron cultivos en mayores volúmenes (fermentadores).

55

Los cultivos fueron realizados a la temperatura óptima de la levadura, y con diferentes grados de agitación (50 rpm-500 rpm) para verificar la producción óptima de biomasa, proteína o etanol.

60

En el caso del uso del suero de leche, éste fue autoclavado y centrifugado para obtener un medio rico en lactosa lo más limpio posible.

Se testaron también las concentraciones mínimas y máximas de inóculo para cada uno de los casos.

Ejemplo 3. Determinación de concentraciones de lactosa y de etanol y de la actividad β -galactosidasa

Para la determinación de lactosa y etanol se utilizaron tanto tests comerciales de Roche y otros proveedores (siguiendo siempre las recomendaciones del Proveedor), así como la Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

5 La determinación de la actividad β -galactosidasa se realizó siguiendo el método de Guarente. La Unidad Enzimática (U. E.) se definió como la cantidad de enzima que libera un nmol de o-nitrofenol por minuto en las condiciones del ensayo. Las unidades se dan como U.E./ml de medio de cultivo, ó U.E./mg de proteína.

Ejemplo 4. Producción de β -galactosidasa y etanol de la cepa de la invención en suero de leche en cultivo en tubos de cristal

10 La cepa control y la cepa de la invención se cultivaron en suero de leche dentro de tubos de cristal sellados, y se mantuvieron a 30°C y con agitación suave (aprox. 50 rpm) durante las 72 horas que duró el experimento. En la figura 1 se puede observar la producción de etanol de la cepa de la invención y de la cepa silvestre (usada como control) a lo largo de un cultivo de 72 horas. La cepa de la invención obtuvo 13,8 g de etanol por gramo de células, mientras que la cepa control obtuvo 6,4 g de etanol por gramo de células.

Ejemplo 5. Producción de β -galactosidasa y etanol de la cepa de la invención en suero de leche en cultivo en fermentador

20 La cepa de la invención se cultivó en suero de leche en un fermentador a 30°C. En la figura 2 se puede observar un cultivo de la cepa de la invención en suero de leche, la cantidad de lactosa consumida, la cantidad de etanol producido, así como el crecimiento al cabo de las 68 horas de cultivo.

Ejemplo 6. Producción de β -galactosidasa y etanol de la cepa de la invención en medio de cultivo YPL 5%

25 Se cultivó la cepa de la invención en medio de cultivo YPL 5% (1% extracto de levadura, 0.5% bactopectona y 5% de lactosa) en matraces a 30°C y 150 rpm de agitación. En la figura 3 se puede observar un ejemplo de la capacidad de producir β -galactosidasa que tiene la cepa de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de levadura *Kluyveromyces lactis* depositada en la Colección de Cultivos Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con el número de depósito DSM 24900, que comprende la
- 5 2. secuencia identificada por SEQ ID NO: 1.
3. Cepa de levadura según la reivindicación 1, en que dicha cepa de levadura comprende además las secuencias identificadas por SEQ ID NO: 3, 4 y 5.
4. Cepa de levadura según una de las reivindicaciones 1 ó 2, en que dicha cepa de levadura comprende una secuencia que tiene una identidad del 95% respecto a SEQ ID NO: 1.
- 10 5. Cepa de levadura según la reivindicación 3, en que dicha identidad es del 90%.
6. Una proteína obtenida de la cepa de levadura según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, cuya secuencia de aminoácidos está identificada por la secuencia SEQ ID NO: 2.
7. Un vector que comprende las secuencias identificadas por SEQ ID NO: 1, 3, 4 y 5.
- 15 8. Un procedimiento de obtención de azúcares, en que se cultiva una cepa de levadura *Kluyveromyces lactis* que comprende la secuencia identificada por SEQ ID NO: 1 en presencia de un medio que comprende lactosa.
9. Procedimiento según la reivindicación 7, en que dicho medio que comprende lactosa está seleccionado entre el grupo compuesto por leche, suero lácteo, suero resultante de la preparación de mantequilla, suero resultante después de la precipitación de la caseína, permeado de leche, permeado de suero, suero ácido y medio de cultivo YPL.
- 20 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7 u 8, en que dichos azúcares son glucosa y/o galactosa.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en que dicha cepa de levadura comprende una secuencia que tiene una identidad del 95% respecto a SEQ ID NO: 1.
12. Procedimiento según la reivindicación 10, en que dicha identidad es del 90%.
- 25 13. Un procedimiento de obtención de etanol en que se cultiva una cepa de levadura *Kluyveromyces lactis* que comprende la secuencia identificada por SEQ ID NO: 1 en presencia de un medio que comprende lactosa.
14. Procedimiento según la reivindicación 12, en que dicho medio que comprende lactosa está seleccionado entre el grupo compuesto por leche, suero lácteo, suero resultante de la preparación de mantequilla, suero resultante después de la precipitación de la caseína, permeado de leche, permeado de suero, suero ácido y medio de cultivo YPL.
- 30 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, en que dicha cepa de levadura comprende una secuencia que tiene una identidad del 95% respecto a SEQ ID NO: 1.
16. Procedimiento según la reivindicación 14, en que dicha identidad es del 90%.
- 35 17. Un procedimiento de obtención de la proteína identificada por la secuencia SEQ ID NO: 2, en que se cultiva una cepa de levadura *Kluyveromyces lactis* que comprende la secuencia identificada por SEQ ID NO: 1 en presencia de un medio que comprende lactosa.
18. Procedimiento según la reivindicación 16, en que dicho medio que comprende lactosa está seleccionado entre el grupo compuesto por leche, suero lácteo, suero resultante de la preparación de mantequilla, suero resultante después de la precipitación de la caseína, permeado de leche, permeado de suero, suero ácido y medio de cultivo YPL.
- 40 19. Procedimiento según una de las reivindicaciones 16 o 17, en que dicha cepa de levadura comprende una secuencia que tiene una identidad del 95% respecto a SEQ ID NO: 1.
20. Procedimiento según la reivindicación 18, en que dicha identidad es del 90%.

21. Un procedimiento de obtención de biomasa, en que se cultiva una cepa de levadura *Kluyveromyces lactis* que comprende la secuencia identificada por SEQ ID NO: 1 en presencia de un medio que comprende lactosa.
- 5 22. Procedimiento según la reivindicación 20, en que dicho medio que comprende lactosa está seleccionado entre el grupo compuesto por leche, suero lácteo, suero resultante de la preparación de mantequilla, suero resultante después de la precipitación de la caseína, permeado de leche, permeado de suero, suero ácido y medio de cultivo YPL.
23. Procedimiento según una de las reivindicaciones 20 o 21, en que dicha cepa de levadura comprende una secuencia que tiene una identidad del 95% respecto a SEQ ID NO: 1.
- 10 24. Procedimiento según la reivindicación 22, en que dicha identidad es del 90%.

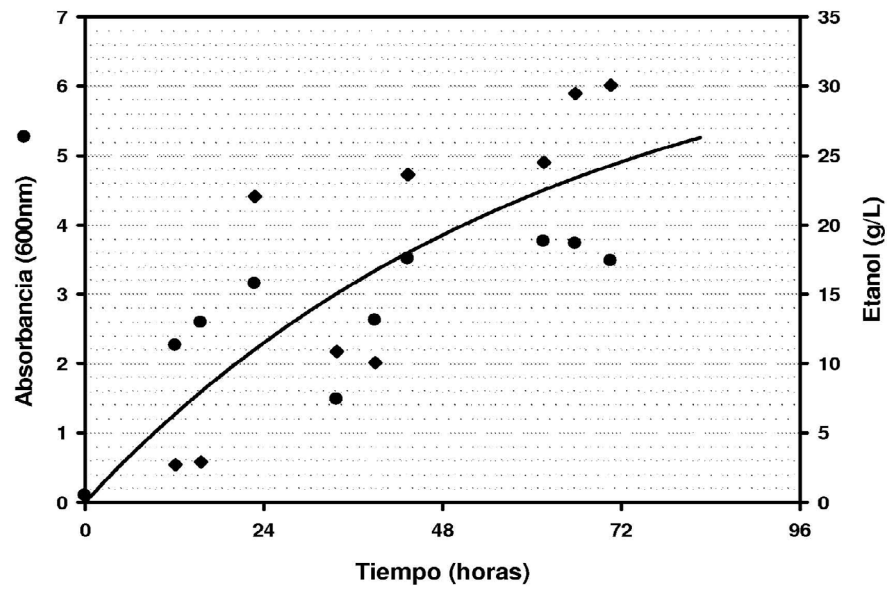
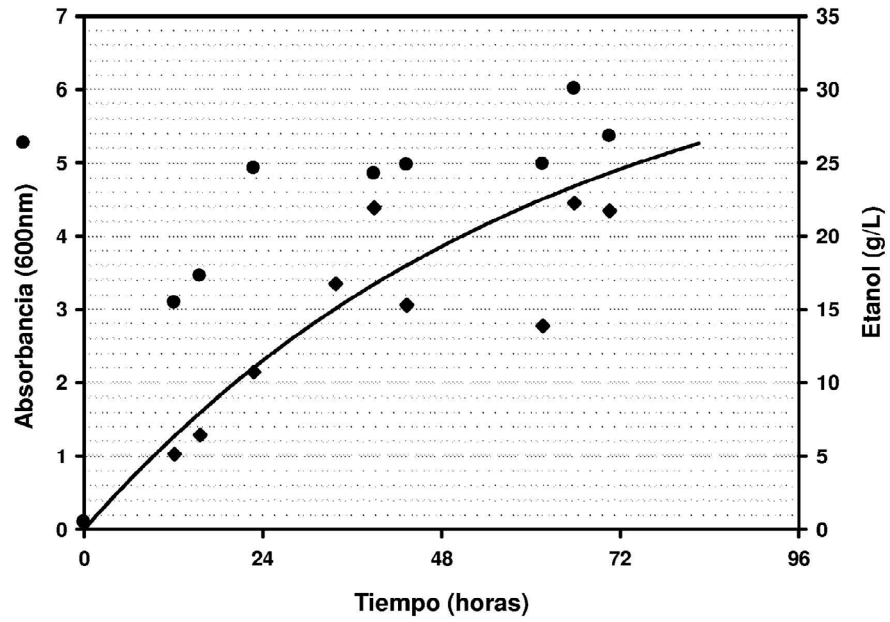


Fig. 1

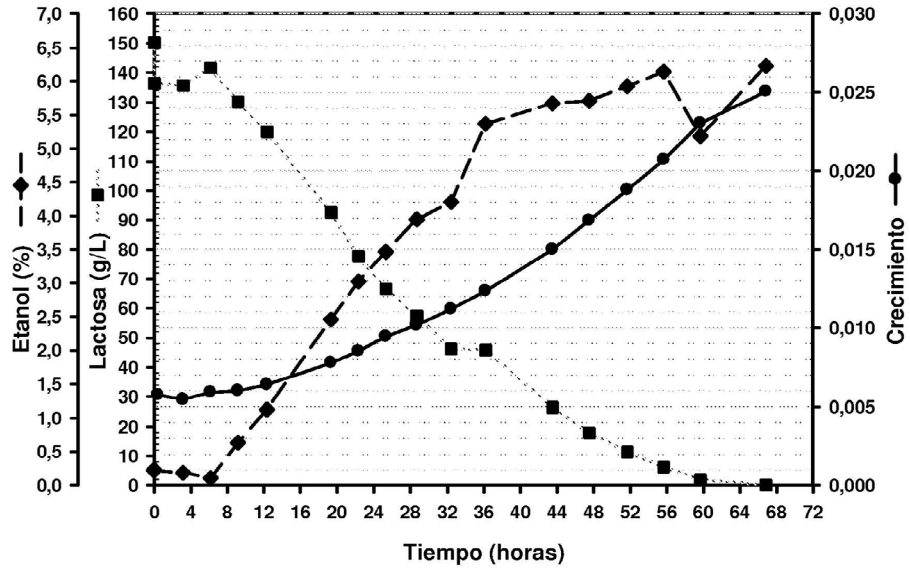


Fig. 2

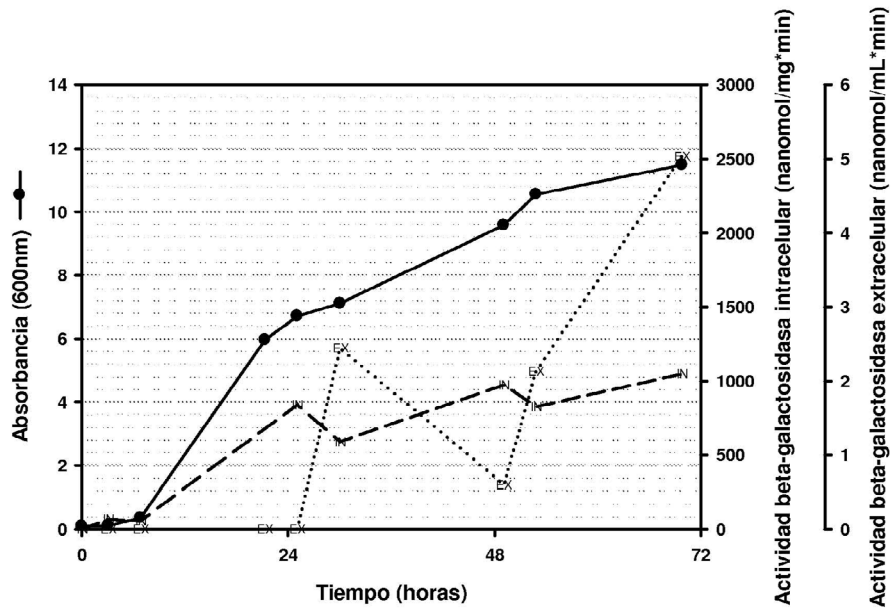


Fig. 3

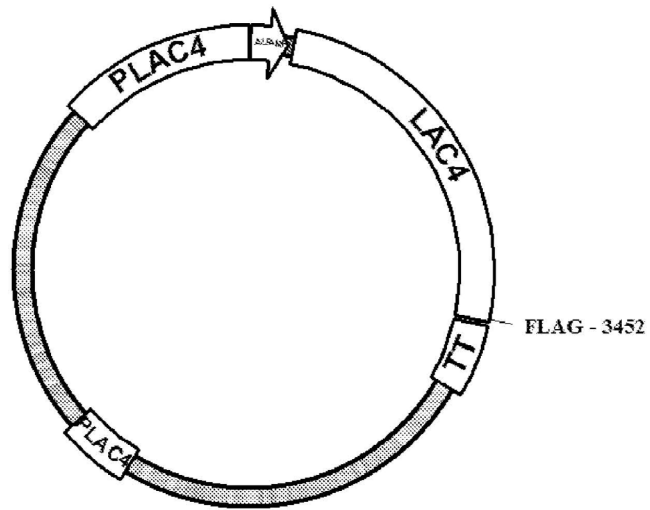


Fig. 4



- ②① N.º solicitud: 201131065
②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.06.2011
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2319489 A1 (UNIVERSIDADE DA CORUÑA) 07.05.2009, resumen; página 4, línea 19 – página 5, línea 30; página 6, líneas 27-47; página 7, línea 65 – página 9, línea 44; página 10, líneas 28-29,53-67; página 11, líneas 1-2,39-59; página 12, líneas 6-7; página 13, líneas 35-63; página 14, líneas 24-42; reivindicaciones 12-15,23; SEQ ID NO 2.	1-23
A	BECERRA M., RODRIGUEZ-BELMONTE E., CERDÁN M. E., GONZALEZ-SISO M. I. "Engineered autolytic yeast strains secreting <i>Kluyveromyces lactis</i> beta-galactosidase for production of heterologous proteins in lactose media." Journal of Biotechnology (2004) Vol. 109, páginas 131-137. Resumen y página 132.	1-23
A	BECERRA M., DIAZ PRADO S., CERDÁN E., GONZÁLEZ-SISO M.I. "Heterologous <i>Kluyveromyces lactis</i> beta-galactosidase secretion by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> super-secreting mutants." Biotechnology Letters (2001) Vol. 23, páginas 33-40. Todo el documento.	1-23
A	BECERRA M., DÍAZ PRADO S., GONZÁLEZ-SISO M.I. CERDÁN M. E. "New secretary strategies for <i>Kluyveromyces lactis</i> beta-galactosidase." Protein Engineering (2001) Vol. 14, páginas 379-386. Todo el documento.	1-23

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
13.02.2013

Examinador
M. J. García Bueno

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/16 (2006.01)
C07K14/39 (2006.01)
C12P7/06 (2006.01)
C12P19/02 (2006.01)
C12P21/02 (2006.01)
C12R1/645 (2006.01)

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

C12N, C07K, C12P, 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, XPESP, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.02.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-23	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-23	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	ES 2319489 A1 (UNIVERSIDADE DA CORUÑA)	07.05.2009
D02	BECERRA M., RODRIGUEZ-BELMONTE E., CERDÁN M. E., GONZALEZ-SISO M. I. "Engineered autolytic yeast strains secreting <i>Kluyveromyces lactis</i> beta-galactosidase for production of heterologous proteins in lactose media." Journal of Biotechnology (2004) Vol. 109, páginas 131-137. Resumen y página 132.	2004
D03	BECERRA M., DIAZ PRADO S., CERDÁN E., GONZÁLEZ-SISO M.I. "Heterologous <i>Kluyveromyces lactis</i> beta-galactosidase secretion by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> super-secreting mutants." Biotechnology Letters (2001) Vol. 23, páginas 33-40. Todo el documento.	2001
D04	BECERRA M., DÍAZ PRADO S., GONZÁLEZ-SISO M.I. CERDÁN M. E. "New secretary strategies for <i>Kluyveromyces lactis</i> beta-galactosidase." Protein Engineering (2001) Vol. 14, páginas 379-386. Todo el documento.	2001

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 de invención consiste en una cepa de levadura *Kluyveromyces lactis* depositada en la Colección de Cultivos Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con el número de depósito DSM 24900, que comprende la secuencia identificada SEQ ID NO: 1 (reivindicaciones 1-4), la proteína obtenida de la cepa de levadura (reivindicación 5) y el vector que comprende las secuencias identificadas por SEQ ID NO: 1, 3, 4 y 5 (reivindicación 6).

La presente solicitud de invención también consiste en un procedimiento de obtención de azúcares, etanol, la proteína y de biomasa (reivindicaciones 7-23).

El documento D01 consiste en cepas de levadura capaces de secretar beta-galactosidasa al medio y su uso para la producción de biomasa, etanol, beta-galactosidasa y proteínas de interés.

El documento D02 consiste en la construcción de mutantes de *S.cerevisiae* donde se secreta beta-galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (ver resumen y página 132).

El documento D03 consiste en varias cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con un fenotipo super secretor que se han transformado mediante la secreción de un plásmido que contiene el gen LAC4. Estas cepas han demostrado ser eficaces en la secreción de beta-galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* y crecen en medios que contienen lactosa (ver todo el documento).

El documento D04 consiste en la construcción de plásmidos por fusión del gen LAC4. Con estos plásmidos se transforman cepas de la levadura *K. lactis* y *S. cerevisiae* y se prueba la actividad extracelular de la beta-galactosidasa en diferentes medios (ver todo el documento).

1.- NOVEDAD (Art. 6.1 Ley 11/1986).

El objeto de las reivindicaciones 1-23 es nuevo según el artículo 6.1 Ley 11/1986.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 Ley 11/1986).

El documento D01 se considera el más representativo del estado de la técnica y divulga una cepa de levadura que comprende una construcción de ADN que codifica para la proteína de fusión que comprende la forma madura de la beta-galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* y el péptido FLAG (ver SEQ ID NO 2).

El documento D01 también divulga un procedimiento de obtención de azúcares, de obtención de etanol, de obtención de la proteína identificada por la secuencia SEQ ID NO 2, y un procedimiento de obtención de biomasa (ver resumen, página 4, línea 19-página 5, línea 30, página 6, líneas 27-47, página 7, línea 65-página 9, línea 44, página 10, líneas 28-29 y 53-67, página 11, líneas 1-2 y 39-59, página 12, líneas 6-7, páginas 13, líneas 35-63, página 14, líneas 24-42, reivindicaciones 12-15 y 23, y SEQ ID NO 2).

El documento D01 consiste principalmente en una construcción que contiene una secuencia la secuencia señal del preprofactor alfa de *S. cerevisiae*. Sin embargo, en la página 6, líneas 27-47 se contempla el uso de secuencias señal de cualquier péptido secretado, y divulga como ejemplos ilustrativos de secuencias señal que pueden usarse en el contexto del documento D01 la secuencia señal del preprofactor alfa de *Kluyveromyces lactis*.

Por tanto, la secuencia identificada por SEQ ID NO 1 ya está divulgada en el documento D01.

Por lo tanto, el objeto de la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-23, aunque es nuevo según el artículo 8.1 Ley 11/1986, no implica actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 Ley 11/1986.