

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 82 03944

(54)

Levure tueuse.

(51)

Classification internationale (Int. Cl.³). C 12 N 15/00 // C 12 R 1/865.

(22)

Date de dépôt..... 9 mars 1982.

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée : Japon, 9 mars 1981, n° 33453/81.

(41)

Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 36 du 10-9-1982.

(71)

Déposant : Société dite : MITSUBISHI CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED, résidant au Japon.

(72)

Invention de : Norio Gunge.

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : Cabinet Plasseraud,
84, rue d'Amsterdam, 75009 Paris.

Levure tueuse

La présente invention concerne une levure tueuse.

Les levures de saké présentant un caractère tueur sont connues comme utiles pour éviter la contamination par les levures sauvages rencontrées lors du brassage du saké. Ces levures tueuses du saké présentent une 5 immunité (résistance) vis-à-vis des toxines tueuses, si bien que la préparation et l'emploi d'excellentes levures de saké présentant une activité tueuse constituent un avantage car non seulement ces levures ne 10 peuvent pas être tuées par les levures tueuses sauvages qui leur sont mélangées, mais elles peuvent également éviter la contamination par les souches de levures sauvages sensibles à la toxine tueuse qui sont encore plus souvent rencontrées. En ce qui concerne la lutte contre 15 la contamination par les levures sauvages, on préfère les levures qui résistent au plus grand nombre possible de types de toxines tueuses (également appelées substances tueuses) que peuvent produire les levures tueuses sauvages et qui ont une action tueuse vis-à-vis d'autant 20 de types de levures sauvages qu'il est possible. Les souches tueuses de Saccharomyces cerevisiae actuellement connues ne sont cependant pas satisfaisantes à cet égard.

A la suite de recherches poussées, la demanderesse a découvert que l'on peut obtenir une levure 25 tueuse ayant une résistance aux toxines tueuses et une activité tueuse vis-à-vis d'une gamme étendue de types de levures par introduction d'un certain plasmide dans Saccharomyces cerevisiae selon une technique de fusion 30 cellulaire ou de transformation. Ceci constitue la base de l'invention. En résumé, l'essence de l'invention est un Saccharomyces cerevisiae résistant aux toxines tueuses produites par les souches tueuses de Kluyveromyces lactis et ayant le même caractère tueur que lesdites

souches tueuses.

L'invention va maintenant être décrite de façon détaillée.

La levure tueuse selon l'invention appartient à
 5 Saccharomyces cerevisiae et présente une résistance aux
 toxines tueuses produites par les souches tueuses de
Kluyveromyces lactis régulées par des plasmides d'ADN
 bicaténaire (pGK^l-1 et pGK^l-2) (par exemple la souche
 IFO 1267 ou la souche ATCC 8585 ; la référence IFO
 10 étant celle attribuée par le Foundation Institute of
 Fermentation, Osaka à ladite souche qui y est déposée
 et la référence ATCC étant celle attribuée par l'Ameri-
 can Type Culture Collection) et le même caractère tueur
 que les souches tueuses de Kluyveromyces lactis. La
 15 levure tueuse selon l'invention a une activité tueuse
 vis-à-vis de plus de types de levures que les souches
 tueuses actuellement connues de Saccharomyces cerevi-
siae régulées par des plasmides d'ARN bicaténaire, par
 exemple la souche portant le numéro B060 (numéro ATCC
 20 42750) et la souche portant le numéro B 511-4C (numéro
 ATCC 38659). Donc, cette levure tueuse selon l'inven-
 tion a de même que les souches tueuses de Kluyveromyces
lactis, par exemple la souche IFO 1267, une activité
 tueuse vis-à-vis des souches suivantes :

25 1) Souches sensibles à l'activité tueuse (c'est-à-dire
 qui sont tuées par la levure tueuse selon l'invention) :

<u>Sacchararomyces cerevisiae</u>	G102D
	AH 22 (ATCC 38626)
	M1-7C
30	B0 60 (souche tueuse)
	F 38-4A tueur (souche tueuse)
	B511-4C (souche tueuse)
<u>Kluyveromyces lactis</u>	IFO 1903
35	IFO 0433
	L3d

- L4
L5
- Kluyveromyces thermotolerans IFO 0662
Kluyveromyces vanudenii IFO 1673
5 Saccharomyces rouxii M1
M7
Torulopsis glabrata IFO 0005
IFO 0662
Candida utilis IFO 0396
10 Candida intermedia IFO 0761
2) Souches sensibles à l'activité tueuse mais de façon
faible :
Saccharomyces italicus IFO 0523
IFO 1049
15 Kluyveromyces lactis W600B (ATCC 32143)

Les souches de la levure tueuse selon l'invention comme indiqué ci-dessus, comprennent la souche de Saccharomyces cerevisiae F 102-2 (déposée à "l'Agency of Industrial Science and Technology, the Fermentation Research Institute au Japon" ; le numéro d'enregistrement pour la demande de dépôt du micro-organisme est 5903) ; le nouveau numéro de dépôt international conforme au traité de Budapest effectué le 24 Février 1982 étant FERM-PB-106.

25 De plus, la levure tueuse selon l'invention peut être définie comme ayant une résistance vis-à-vis des toxines tueuses produites par les souches tueuses de Saccharomyces cerevisiae (par exemple la souche B060) ainsi que vis-à-vis de celles produites par les souches tueuses de Kluyveromyces lactis et comme ayant le même caractère tueur que les souches tueuses de Saccharomyces cerevisiae (par exemple la souche B060) et celles de Kluyveromyces lactis. Donc, en conclusion, la levure tueuse de l'invention a l'activité tueuse des souches tueuses de Kluyveromyces lactis et de celles de Saccharomyces cerevisiae. Concrètement, l'activité tueuse

(en d'autres termes la mort des souches provoquée par la levure selon l'invention) est également observée dans Saccharomyces italicus en plus des souches indiquées ci-dessus. De plus, cette activité est généralement suffisante dans le cas des souches IFO 0253 et 1049 de Saccharomyces italicus qui figurent parmi les souches indiquées en 2) ci-dessus comme n'ayant qu'une sensibilité limitée à l'activité tueuse.

La levure tueuse selon l'invention est préparée par introduction de plasmides présents dans une souche tueuse de Kluyveromyces lactis (pGKl-1 et pGKl-2) décrits dans Journal of Bacteriology, vol. 145, pp. 382-390 (1981)) selon une technique de fusion cellulaire ou de transformation.

On peut par exemple utiliser une souche appartenant à Saccharomyces cerevisiae Hansen, par exemple la souche AH22 (ATCC 38626), la souche B060 (ATCC 42750) ou similaires comme souches de Saccharomyces cerevisiae constituant l'accepteur des plasmides. En particulier, on préfère utiliser un mutant ρ^0 c'est-à-dire une souche dépourvue d'ADN mitochondrial. On préfère utiliser la souche B060 ou similaires lorsqu'on désire obtenir la levure tueuse selon l'invention résistant aux souches tueuses de Saccharomyces cerevisiae et ayant le caractère tueur desdites souches tueuses. Comme plasmides, on peut utiliser pGKl-1 et pGKl-2 présents dans les souches tueuses de Kluyveromyces lactis, par exemple la souche IFO 1267, comme décrit dans Journal of Bacteriology, vol. 145, pp. 382-390 (1981).

Les plasmides pGKl-1 et pGKl-2 sont des plasmides d'ADN linéaire ayant respectivement des poids moléculaires de $5,4 \pm 0,1 \times 10^6$ daltons et $8,4 \pm 0,1 \times 10^6$ daltons et la même masse volumique de $1,687 \text{ g/cm}^3$. Les propriétés de leur digestion par divers types d'enzymes de restriction sont les suivantes :

1) pGK ℓ -1 :

Avec EcoRI : digéré en deux fragments (p.m. : $2,4 \times 10^6$ et $3,0 \times 10^6$, l'unité étant le dalton (il en est de même ci-après)).

5 Avec Hind III : digéré en trois fragments ($0,5 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$ et $3,4 \times 10^6$).

Avec BglIII : digéré en trois fragments ($4,0 \times 10^6$, $0,96 \times 10^6$ et $0,54 \times 10^6$).

10 Avec Hinc II : digéré en deux fragments ($4,1 \times 10^6$ et $1,4 \times 10^6$).

Avec PstI : digéré en trois fragments ($0,5 \times 10^6$, $1,0 \times 10^6$ et $3,9 \times 10^6$).

Avec BamHI : digéré en deux fragments ($2,7 \times 10^6$ et $2,7 \times 10^6$).

15 Avec XhoI, HaeII, SmaI, SalI et HapI : non digéré.

2) pGK ℓ -2 :

Avec EcoRI : digéré en sept fragments ($2,5 \times 10^6$, $2,3 \times 10^6$, $0,95 \times 10^6$, $0,85 \times 10^6$, $0,7 \times 10^6$, $0,55 \times 10^6$ et $0,5 \times 10^6$).

20 Avec BamHI : digéré en deux fragments ($3,6 \times 10^6$ et $4,8 \times 10^6$).

Avec HindIII, PstI, HpaI, XhoI, HaeII, SmaI et HincII : non digéré.

25 Pour construire la levure tueuse selon l'invention, on introduit les deux plasmides pGK ℓ -1 et pGK ℓ -2 dans Saccharomyces cerevisiae.

Dans le cas où l'on utilise une technique de fusion cellulaire pour préparer la levure tueuse selon l'invention, on mélange de façon classique les protoplastes de Kluyveromyces lactis hébergeant les plasmides ci-dessus avec ceux de Saccharomyces cerevisiae puis on traite le mélange par le polyéthylèneglycol. Après ce traitement, on étale le mélange sur un milieu sélectif isotonique approprié sur lequel seuls les protoplastes de Saccharomyces cerevisiae peuvent se régénérer pour
35 fournir la levure tueuse désirée.

Si l'on effectue la préparation selon une technique de transformation, on ajoute de façon classique les plasmides mentionnés ci-dessus à des protoplastes des souches de Saccharomyces cerevisiae, puis on traite
5 par le polyéthylèneglycol, puis on disperse le mélange dans un milieu isotonique. On isole ensuite les souches ayant la fonction tueuse des colonies des protoplastes régénérés.

On obtient la levure tueuse selon l'invention
10 comme précédemment indiqué. De plus, également selon l'invention, on peut produire des produits protéiques utiles par introduction d'ADN exogène (par exemple des gènes codant pour la production d'hormones polypeptidiques humaines, d'enzymes, de vaccins, etc). dans les
15 plasmides ci-dessus ou une partie d'entre eux (par exemple une partie dans laquelle demeurent les portions correspondant au promoteur, à l'origine de répllication et au facteur tueur mais dont les autres portions inutiles à la répllication du plasmide ou à l'expression
20 des gènes introduits sont éliminées), selon des techniques de recombinaison de l'ADN. Dans ce cas, l'activité tueuse est utile comme marqueur de transformation.

L'invention qui vient d'être décrite de façon générale sera mieux comprise à la lecture des exemples
25 illustratifs et nullement limitatifs suivants.

Exemple 1 (préparation de la levure tueuse selon une technique de fusion cellulaire).

On prépare des protoplastes à partir de 2 g d'une souche tueuse de Kluyveromyces lactis appelée
30 souche 2105-1D (a ade leu pGK1-1 et pGK1-2) (cette souche est une des spores en tétrade obtenues par croisement entre la souche IFO 1267 de Kluyveromyces lactis et la souche W600B de Kluyveromyces lactis) et à partir de 0,8 g d'une souche non tueuse de Saccharo-
35 myces cerevisiae appelée souche AH22 (a leu 2-3, leu 2-112 his 4-519 can1 p°) et on les ajoute respec-

tivement à 10 et 5 ml de solutions tampons (solutions de tampon citrate-phosphate 0,1 M à pH 6,1) pour préparer des suspensions. On mélange 2 millilitres des suspensions respectives et on centrifuge à 2 000 tr/min pendant 10 minutes. On ajoute au colot obtenu 4 ml d'une solution aqueuse à 33 % de polyéthylèneglycol 50 mM en CaCl_2 et on incube le mélange à 30°C pendant 30 minutes. On centrifuge le mélange à 2 000 tr/min pendant 10 minutes et on ajoute une solution aqueuse 0,6 M de KCl au culot obtenu pour préparer une solution que l'on coule sur un milieu NB (base azotée fabriquée par Difco Laboratories) + leucine (leu) + histidine (his) + glucose (stabilisé par du KCl 0,6 M), ce milieu convenant à la régénération des protoplastes de la souche AH22 de Saccharomyces cerevisiae. On obtient de nombreuses colonies par incubation à 30°C pendant environ 5 jours. On isole 243 de ces colonies dont on examine les marqueurs génétiques et le caractère tueur. Sur 236 colonies ayant les mêmes marqueurs génétiques nucléiques que la souche AH22 de Saccharomyces cerevisiae (type d'appariement a ; besoins de leucine et d'histidine et résistance à la canavanine (a leu 2-3, 2-112 his 4-519 can1)), 61 présentent le caractère tueur particulier à Kluyveromyces lactis (propriété de tuer la souche tueuse B511-4C de Saccharomyces cerevisiae). Par appréciation combinée des résultats des essais effectués par analyse sur gel d'agarose pour déterminer si les plasmides sont hébergés ou non, et d'autres observations de caractère taxonomique, y compris les caractéristiques morphologiques des cellules et autres (par exemple l'incapacité d'assimiler le lactose et la sensibilité au cycloheximide), il semble que les plasmides pGK1 aient été transférés de Kluyveromyces lactis à Saccharomyces cerevisiae par suite de la fusion cellulaire et qu'ils se soient répliqués pour conférer la fonction tueuse. Cette souche est

appelée souche F102-2 de Saccharomyces cerevisiae (déposée à l'Agency of Industrial Science and Technology, the Fermentation Research Institute sous le numéro d'enregistrement 5903 pour la demande de dépôt du micro-
5 organisme) et sous le numéro d'enregistrement national FERM-PB-106.

Exemple 2 (préparation de la levure tueuse selon une technique de transformation).

On transforme 1 g de la souche AH22 de Saccharo-
10 myces cerevisiae (a leu 2-3, 2-112 his 4-519 can1 ρ^o) en protoplastes que l'on lave trois fois avec une solution aqueuse 0,6 M en KCl et que l'on centrifuge à 3 000 tr/min pendant 10 minutes. On met le culot obtenu en suspension dans 15 ml d'une solution de tampon Tris-
15 HCl 10 mM (50 mM en CaCl_2 et 0,6 M en KCl). A 10 μl de la suspension obtenue, on ajoute 10 μl d'une solution aqueuse 3,6 M de KCl puis on ajoute 40 μl d'une solution de tampon Tris-HCl 10 mM à pH 7,6 contenant 0,5 μg de pGK ℓ -1 et 0,5 μg de pGK ℓ -2 (les plasmides pGK ℓ -1 et
20 pGK ℓ -2 ont été préparés selon le procédé décrit dans Journal of Bacteriology, vol. 145, pp. 382-390) (contenant en outre une concentration en EDTA de 3 mM). On maintient le mélange obtenu (60 μl) au bain glacé pendant 30 minutes, puis on ajoute 500 μl d'une solution
25 de tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7,6) contenant 40 % de polyéthylèneglycol (p.m. : 6 000), 50 mM en CaCl_2 et 0,6 M en KCl puis on incube à 30°C pendant 60 minutes en agitant doucement. Après addition d'une solution aqueuse 0,6 M de KCl, on étale le mélange sur un milieu
30 YEPD isotonique et on incube à 30°C pendant 4 jours pour obtenir 6 000 colonies de protoplastes régénérés. On isole 2 000 de ces colonies dont on examine la fonction tueuse en utilisant comme organisme test la souche B511-4C de Saccharomyces cerevisiae. Sur ces colonies,
35 deux sont transformées (tueuses). Les sous-clones obtenus par purification de ces deux souches transformées

ont les mêmes propriétés génétiques (a leu 2-3, 2-112 his 4-519 can1) et les mêmes propriétés taxonomiques (sensibilité au cycloheximide et incapacité d'assimiler le lactose) que la souche parente AH22, et de plus présentent la fonction tueuse des souches tueuses de Kluyveromyces lactis. Egalement tous les sous-clones hébergent les plasmides pGK $\emptyset$ comme le montre l'analyse sur gel d'agarose.

5 Exemple 3 (préparation de la levure tueuse selon une
10 technique de fusion cellulaire).

On prépare des protoplastes de Saccharomyces cerevisiae présentant le caractère tueur propre à Kluyveromyces lactis et de la souche tueuse 8060 de Saccharomyces cerevisiae et on les soumet à une fusion
15 cellulaire selon la technique de fusion cellulaire décrite dans l'exemple 1. On effectue simultanément la fusion nucléaire et le mélange cytoplasmique et la souche de Saccharomyces cerevisiae obtenue a le caractère tueur de Kluyveromyces lactis et de la souche 8060
20 de Saccharomyces cerevisiae.

Exemple 4 (détermination de l'activité tueuse).

On effectue la détermination de l'activité tueuse selon la technique sur gélose au bleu de méthylène décrite dans Journal of Bacteriology, vol. 145, pp.
25 382-390. On incube des cellules d'une souche d'étude (souche dont on désire déterminer si elle est tuée ou non) dans le milieu YEPD (1 % d'extrait de levure + 2 % de peptone + 2 % de glucose). On met ensuite la souche en suspension dans l'eau stérile et on étale
30 0,1 ml de la suspension obtenue (10^7 cellules/ml) sur un milieu de détermination du caractère tueur (1 % d'extrait de levure + 2 % de peptone + 2 % de glucose + 0,003 % de bleu de méthylène + 2,5 % de gélose + tampon citrate-phosphate 0,05 M à pH 5,0).

35 Pour examiner l'activité tueuse, on ensemence en strie avec les cellules d'une souche de la levure

tueuse (la souche dont on désire déterminer si elle a une activité tueuse) cultivée sur gélose YEPD, un milieu d'essai préparé comme précédemment indiqué sur lequel on a étalé les cellules de la souche d'étude et on incube à 25°C pendant 2 à 3 jours. On observe une zone claire autour de la levure tueuse si elle a une activité tueuse. Dans le tableau suivant, les résultats sont exprimés selon les critères suivants :
 + : tueuse ; - : non tueuse ; et $\pm$: faiblement tueuse, c'est-à-dire présence d'une petite zone d'activité tueuse autour de la levure tueuse.

Les résultats de la détermination de l'activité tueuse des levures tueuses selon l'invention préparées dans les exemples 1 à 3 avec les souches d'étude indiquées dans le tableau ci-dessous figurent dans ce même tableau. De plus, le tableau montre l'activité tueuse des souches tueuses de Saccharomyces cerevisiae (B060 et B511-4C) et de la souche tueuse de Kluyveromyces lactis (IFO 1267).

20

TABLEAU

Souches d'étude	Exemple 1	Exemple 2	Exemple 3	<u>S. cerevisiae</u> B060 et B511-4C °1	<u>K. lactis</u> IFO 1267 °2
<u>S. cerevisiae</u> G102D M1-7C B060 F38-4A B511-4C AH22	+ + + + + +	+ + + + + +	+ + + + + +	+ + - - - +	+ + + + + +

35

.../...

	Souches d'étude	Exem- ple 1	Exem- ple 2	Exem- ple 3	<u>S.</u> <u>cerevi-</u> <u>siae</u> B060 et B511- 4C °1	<u>K.</u> <u>lactis</u> IFO 1267 °2
5						
	<u>S. italicus</u>					
	IFO 0253	+	+	+	+	+
10	IFO 0725	-	-	+	+	-
	IFO 1049	+	+	+	+	+
	<u>K. lactis</u>					
	IFO 1903	+	+	+	-	+
	K43	-	-	-	-	-
15	L3 ^a	+	+	+	-	+
	WM37	-	-	-	-	-
	W600B	+	+	+	-	+
	K51	-	-	-	-	-
	L4	+	+	+	-	+
20	L5	+	+	+	-	+
	IFO 0648	-	-	-	-	-
	IFO 1090	-	-	-	-	-
	IFO 1267	-	-	-	-	-
	<u>K. thermotolerans</u>					
25	IFO 0662	+	+	+	-	+
	IFO 1050	-	-	-	-	-
	IFO 1674	-	-	-	-	-
	IFO 1778	-	-	-	-	-
	IFO 1779	-	-	-	-	-
30	IFO 1780	-	-	-	-	-
	<u>K. africanus</u>					
	IFO 1671	-	-	-	-	-
	<u>K. drosophilae</u>					
	IFO 1012	-	-	-	-	-
35	<u>K. marxianus</u>					
	IFO 0219	-	-	-	-	-

.../...

	Souches d'étude	Exem- ple 1	Exem- ple 2	Exem- ple 3	<u>S.</u> <u>cerevi-</u> <u>siae</u> BO60 et B511- 4C °1	<u>K.</u> <u>lactis</u> IFO 1267 °2
5						
	<u>K. phaffi</u>					
	IFO 1672	-	-	-	-	-
10	<u>K. polysporus</u>					
	IFO 0996	-	-	-	-	-
	<u>K. vanudenii</u>					
	IFO 1673	+	+	+	-	+
	<u>K. wickerrhamii</u>					
15	IFO 1675	-	-	-	-	-
	<u>Schizosaccharo-</u> <u>myces pombe</u>					
	M210	-	-	-	-	-
	SG55	-	-	-	-	-
20	M216	-	-	-	-	-
	Levure tueuse de l'exemple 1				+	-
	Levure tueuse de l'exemple 2				+	-
25	Levure tueuse de l'exemple 3				-	-
	<u>S. rouxii</u>					
	M1	+	+	+	-	+
	M7	+	+	+	-	+
30	<u>Torulopsis glabrata</u>					
	IFO 0005	+	+	+	+	+
	IFO 0662	+	+	+	+	+
	<u>Candida utilis</u>					
	IFO 0396	+	+	+	-	+
35	<u>Candida intermedia</u>					
	IFO 0761	+	+	+	-	+

°1 : la souche B060 et la souche B511-4C ont exactement la même activité tueuse si bien qu'elles figurent dans la même colonne.

S. signifie Saccharomyces.

5 °2 : K. signifie Kluyveromyces.

Comme le montre le tableau 1, les levures tueuses préparées dans les exemples 1 et 2 ont le même caractère tueur que la souche IFO 1267 de K. lactis et la même résistance à cette souche. De plus, la levure
10 tueuse préparée dans l'exemple 3 a le caractère tueur de la souche IFO 1267 de K. lactis et de la souche B060 de S. cerevisiae (ou de la souche B511-4C) et résiste à ces deux souches.

REVENDICATIONS

1. Levures tueuses appartenant aux souches de Saccharomyces cerevisiae, caractérisées par la résistance aux toxines tueuses produites par les souches tueuses de Kluyveromyces lactis et par le même caractère tueur que lesdites souches tueuses.
2. Levures tueuses appartenant aux souches de Saccharomyces cerevisiae selon la revendication 1, caractérisées par la résistance aux toxines tueuses produites par les souches tueuses de Saccharomyces cerevisiae ainsi que celles produites par les souches tueuses de Kluyveromyces lactis et par le même caractère tueur que les souches tueuses de Saccharomyces cerevisiae et de Kluyveromyces lactis.
3. Levures tueuses appartenant aux souches de Saccharomyces cerevisiae, caractérisées en ce qu'elles sont obtenues en introduisant dans une souche de Saccharomyces cerevisiae des plasmides présents dans une souche tueuse de Kluyveromyces lactis par une technique de transformation ou de fusion cellulaire.
4. Levures tueuses appartenant aux souches de Saccharomyces cerevisiae selon la revendication 3, caractérisées en ce que les plasmides sont introduits dans une souche de Saccharomyces cerevisiae, appartenant aux souches de Saccharomyces cerevisiae Hansen, telle que la souche désignée par AH 22, déposée sous le n° ATCC 38 626 ou la souche désignée par B 060, déposée sous le n° ATCC 42 750 ou des souches analogues.
5. Levures tueuses appartenant aux souches de Saccharomyces cerevisiae selon l'une quelconque des revendications 3 ou 4, caractérisées en ce que les plasmides utilisés présents dans une souche tueuse de Kluyveromyces lactis telle que celle désignée par IFO 1267 et de n° ATCC 8585, sont tels que les plasmides pGK1-1 et pGK1-2.
6. Levures tueuses appartenant aux souches de

Saccharomyces cerevisiae présentant les caractéristiques de celles déposées à l'Agency of Industrial Science and Technology, the Fermentation Research Institute au Japon, sous le n° FERM-P 5903 et sous le numéro d'enregistrement international FERM-PB 106.

7. Procédé de préparation de levures tueuses appartenant aux souches de Saccharomyces cerevisiae selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé par le fait que des plasmides présents dans une souche tueuse de Kluyveromyces lactis tels que pGK1 1 et pGK1 2, sont introduits selon une technique de fusion cellulaire ou une technique de transformation dans une souche de Saccharomyces cerevisiae, notamment Saccharomyces cerevisiae Hansen, telle que celle désignée par AH 22 et déposée sous le n° ATCC 38 626 ou celle désignée par B 060 et déposée sous le n° ATCC 42 750 ou des souches analogues.

8. Procédé de préparation de levures tueuses appartenant aux souches de Saccharomyces cerevisiae selon la revendication 7, caractérisé en ce que des protoplastes extraits de Kluyveromyces lactis abritant les plasmides sont mélangés avec ceux provenant de Saccharomyces cerevisiae, et en ce que le mélange est traité avec du polyéthylène glycol, puis est étalé sur un milieu sélectif isotonique approprié sur lequel seuls les protoplastes de Saccharomyces cerevisiae sont susceptibles d'être régénérés pour obtenir la levure tueuse selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

9. Procédé de préparation de levures tueuses appartenant aux souches de Saccharomyces cerevisiae selon la revendication 7, caractérisé en ce que les plasmides présents dans une souche tueuse de Kluyveromyces lactis sont ajoutés aux protoplastes provenant de souches Saccharomyces cerevisiae et traitées au polyéthylène glycol, puis en ce que le mélange est dispersé dans un milieu isotonique et en ce que les souches présentant la fonction tueuse sont isolées à partir des colonies de protoplastes régénérés.

10. Levures appartenant au genre Saccharomyces cerevisiae, caractérisées par le fait qu'elles abritent des plasmides tels que ceux que l'on peut obtenir à partir de Kluyveromyces lactis qui confèrent une résistance
- 5 aux toxines tueuses produites par les souches tueuses de Saccharomyces cerevisiae aussi bien que celles produites par les souches tueuses de Kluyveromyces lactis et ayant les mêmes caractéristiques tueuses que les souches tueuses de Saccharomyces cerevisiae ainsi que
- 10 de Kluyveromyces lactis.