



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 188 335**

② Número de solicitud: 200002425

⑤ Int. Cl.7: **C12Q 1/68**
C12N 15/31

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **06.10.2000**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2003**

Fecha de la concesión: **27.11.2004**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.12.2004**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.12.2004

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Querol Símon, Amparo Mercedes;
López Alonso, M^a Victoria;
Barrio, Eladio;
Fernández-Espinar García, M^a Teresa y
Ramón Vidal, Daniel**

⑳ Agente: **No consta**

② Título: **Procedimiento para la diferenciación de microorganismos eucariotas basado en la amplificación por PCR de zonas variables del DNA mitocondrial.**

③ Resumen:

Procedimiento para la diferenciación de microorganismos eucariotas basado en la amplificación por PCR de zonas variables del DNA mitocondrial.

Esta invención propone un procedimiento para la identificación y caracterización de cepas de microorganismos eucariotas (levaduras y hongos filamentosos) de relevancia clínica o industrial. El método empleado se basa en la amplificación por la técnica de PCR de zonas variables del DNA mitocondrial (mtDNA) utilizando como material de partida una preparación de DNA total, una colonia proveniente de una placa de cultivo o una muestra biológica (alimento, bebida, aislado clínico, etc). Los resultados obtenidos mediante su uso permiten diferenciar cepas de la misma especie.

ES 2 188 335 B1

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

DESCRIPCION

Procedimiento para la diferenciación de microorganismos eucariotas basado en la amplificación por PCR de zonas variables del DNA mitocondrial.

5 **Sector de la técnica**

Identificación y caracterización de cepas de microorganismos eucariotas (levaduras y hongos filamentosos) de relevancia clínica o industrial (industria alimentación). *Saccharomyces*.

10 **Estado de la técnica**

La identificación de cepas microbianas es una necesidad, tanto en las industrias que utilizan dichos organismos como iniciadores de fermentación (producción de antibióticos, alimentos fermentados o bebidas alcohólicas, entre otros) como en clínica humana o veterinaria, donde algunos de ellos son responsables de distintas patologías relevantes. Así mismo, existen microorganismos que, si bien no son patógenos, producen alteraciones organolépticas indeseadas al crecer como contaminantes sobre determinados sustratos (alimentos, bebidas, materias primas, etc). También en estos casos es pertinente la identificación rápida de los mismos. En todos los procesos reseñados intervienen muchos microorganismos eucariotas, tanto levaduras como hongos filamentosos, entre los que pueden destacarse aquellos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Candida*, *Penicillium* o *Saccharomyces*.

La utilización de microorganismos como cultivos iniciadores en la producción de metabolitos o alimentos presenta ciertos riesgos microbiológicos. Por un lado, el crecimiento del microorganismo al objeto de preparar el iniciador industrial debe comprobarse en todos sus lotes para confirmar que la especie producida es la originalmente seleccionada y no un contaminante. Por otro, es deseable que en la industria se compruebe a lo largo del proceso que el microorganismo inoculado se impone al resto de la flora y, sobre la base de su superioridad numérica dirige la fermentación [QUEROL, A. y RAMON, D. (1996). The application of molecular techniques in wine microbiology. Trends Food Sci. Technol., 7 (3): 73-78].

En el caso de las levaduras, los estudios de identificación y caracterización de las diferentes especies, así como de las cepas que pertenecen a una misma especie, han estado basados en criterios morfológicos y fisiológicos [KREGGER-VAN RIJ, N.J.W. (1984). "The yeast, a taxonomic study". Ed: Elsevier Science Publisher B.V; Amsterdam; BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W. y YARROW, U.J. (1990). "Yeast: Characterization and Identification", 2nd edn. Cambridge University Press. London]. Estas características pueden variar en función de las condiciones de cultivo. Aún más, en ocasiones las especies están delimitadas por una única característica fisiológica que en algunos casos está controlada por un sólo gen. También se han desarrollado métodos para la diferenciación de levaduras basados en el análisis de proteínas totales de la célula, patrones de isoenzimas o análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases. La reproducibilidad de todas estas técnicas es cuestionable, ya que dependen en muchos casos del estado fisiológico de la célula (GOLDEN, D.A.; BEUCHAT, L.R. y HITCHCOCK, H.L. (1994). Changes in fatty acid composition of *Zygosaccharomyces rouxi* as influenced by solutes, potassium sorbate and incubation temperature. Int. J. Food Microbiol. 21: 293-303). Una situación similar se da en el caso de los hongos filamentosos (METZENBERG, R.L. (1991). The impact of molecular biology on mycology. Mycological Research 95: 9-13). Frente a ello, las técnicas de biología molecular se presentan como una alternativa a los métodos tradicionales para la caracterización e identificación de levaduras y hongos, ya que en ellas se analiza el genoma, independientemente del estado fisiológico de la célula. Uno de los géneros microbianos en los que más se han aplicado estas técnicas moleculares es *Saccharomyces*. Dichos métodos se han usado para la identificación a nivel de especie (ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F. y QUEROL, A. (1999). Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Int. J. Syst. Bact. 49: 329-337), o inclusive cepa (QUEROL, A.; BARRIO, E.; HUERTA, T. y RAMON, D. (1992a). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2948-2953). Se han utilizado distintas técnicas que comprenden el estudio de los cariotipos mediante electroforesis de cromosomas, la presencia de zonas repetidas en el genoma nuclear o la variabilidad del DNA mitocondrial (mtDNA) [para una revisión ver QUEROL, A. y RAMON, D. (1996). The application of molecular techniques in wine microbiology. Trends Food Sci. Technol., 7 (3): 73-78].

Mediante el uso de electroforesis de cromosomas, se ha observado una gran variabilidad en el número y tamaño de los cromosomas de las diferentes especies levaduriformes, incluidas algunas de interés industrial [QUEROL, A.; BARRIO, E. y RAMON, D. (1992b). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. Syst. Appl. Microbiol. 15: 439-446; CARDINALI G. y MARTINI, A. (1994). Electrophoretic karyotypes of authentic strains of the sensu stricto group of the genus *Saccha-*

romyces. Int. J. Sys. Bacteriol. 4: 791-797; BELLOCH, C; BARRIO, E.; GARCIA, M.D. y QUEROL, A. (1998). Interand intraspecific chromosome pattern variation in the yeast genus *Kluyveromyces*. Yeast 14: 1341-1345] o clínico [ASAKURA, K., IWAGUCHI, S.L., HOMMA, M. SUKAI, T.; HIGASHIDE, K. y TANAKA, K. (1991). Electrophoretic karyotypes of clinically isolated yeasts of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. J. Gen. Microbiol. 137: 253-258; BARCHIESE, F.; HOLLIS, R.J.; MESSER, S.A.; SCALISE, G.; RINALDI, M.G. y PFALLER, M.A. (1995). Electrophoretic karyotype and *in vitro* antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients. Diagnostic Microbiol. Infect. Disease 23: 99-103]. También se ha observado polimorfismo cromosómico entre los diferentes aislados de una misma especie debido a la adición o delección de largos fragmentos de DNA en cromosomas homólogos durante la evolución del genoma de las levaduras [ADAMS, J.; PUSKAS-ROZCA, S.; SIMLAR, J. y WILKE, C.M. (1992). Adaptation and major chromosomal changes in populations of *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Biol. 22: 13-19; LONGO, E. y VEZINHET, F. (1993). Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 59: 322-326; PUIG, S.; QUEROL, A.; BARRIO, E. y PEREZ-ORTIN, J.E. (2000). Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2057-2061]. En general, el polimorfismo cromosomal es mayor en cepas industriales que en cepas de laboratorio, probablemente debido a recombinaciones que pueden producir diferencias en el tamaño de los cromosomas, como se ha observado en cepas vínicas y panaderas de la especie *S. cerevisiae* (CODON, A.C.; BENITEZ, T. y KORHOLA, M. (1997). Chromosomal reorganization during meiosis of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast. Curr. Genet. 32: 247-259). Desde el punto de vista técnico, el análisis de cariotipos no es una técnica rápida, ya que se necesitan aproximadamente 72 horas para obtener resultados una vez aisladas las levaduras. Ello dificulta su aplicación en la clínica o la industria.

El mtDNA de *S. cerevisiae* es una pequeña molécula de 65 a 80 kb cuyo grado de variabilidad puede ser usado para diferenciar aislados de dicha especie. Los genes presentes en el mtDNA contienen intrones y presentan un alto contenido en adenina y timina y regiones intergénicas también muy ricas en adenina y timina interrumpidas por cortas cadenas de G+C (CLARK-WALKER G.D.; MCARTHUR, C.R. y DALEY, D.J. (1981). Evolution of mitochondrial genomes in fungi. Curr. Genet. 4:7-12). Además de la variación en el número y tamaño de las regiones intergénicas e intrónicas también se han encontrado importantes reordenaciones de sus genes, incluso entre cepas de la misma especie (CLARK-WALKER G.D y WEILLER (1994). The structure of the small mitochondrial DNA of *Kluyveromyces thermotolerans* is likely to reflect the ancestral gene order in fungi. J. Mol. Evol. 38: 593-601). Como conclusión, podemos decir que aproximadamente dos tercios del genoma mitocondrial de *Saccharomyces* está constituido por regiones aparentemente no codificantes, que son la fuente de variación en el genoma mitocondrial. Este criterio ha sido utilizado para diferenciar cepas industriales cerveceras y vínicas del género *Saccharomyces* y fue motivo de una patente previa (QUEROL, A.; BARRIO, E.; HUERTA, T. y RAMON, D. (1992a). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2948-2953.). Un método rápido para la diferenciación y caracterización de cepas y/o especies de levaduras y hongos filamentosos basado en el análisis de restricción del DNA mitocondrial. (Patente de Invención P9202480). Dicha patente se basa en el análisis con determinadas enzimas de restricción del mtDNA a partir de muestras de DNA total de la levadura. Con ello se evita la utilización de ultracentrífugas y gradientes de CsCl, dos factores limitantes para su utilización en la industria. Esta técnica no requiere material sofisticado ni personal especializado y se puede aplicar a otros géneros de levaduras y hongos. Lamentablemente, su ejecución es tediosa e implica un tiempo variable entre 24 y 48 horas.

Las técnicas moleculares más rápidas son las basadas en la técnica de PCR (polymerase chain reaction). Una de ellas es la denominada RAPD (random amplified polymorphic DNA) que consiste en la amplificación aleatoria de un DNA genómico con un único oligonucleótido corto (aproximadamente de 10 nucleótidos) de secuencia arbitraria [BRUNS, T.D.; WHITE, T.J. y TAYLOR, J.W. (1991). Fungal molecular systematics. Annu. Rev. Ecol. Syst. 22: 524-564; QUESADA, M.P. y CENIS, J.L. (1995). Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the characterization of wine yeast. Am. J. Enol. Vitic. 46: 204-208]. Las diferencias que se encuentran con esta técnica permiten discernir a nivel de cepa, de manera que puede ser útil para llevar a cabo estudios a nivel de poblaciones. Sin embargo, este método tiene varios inconvenientes. Uno de los más importantes es que el patrón obtenido es altamente sensible a las diferentes variables del proceso de amplificación (concentración de Mg^{+2} , tipo de DNA polimerasa, concentración de DNA en la muestra, temperaturas de amplificación, etc), lo que resulta en una falta de reproducibilidad de los resultados. Basándose en la técnica del PCR se han desarrollado métodos para la identificación de cepas de levaduras basados en la amplificación de secuencias que se repiten en el genoma. En *S. cerevisiae* existen muchas secuencias repetidas, siendo una de ellas las denominadas secuencias δ que son elementos de 0.3 kb que flanquean los retrotransposones Ty1. Cerca de 100 copias de esta secuencia están presentes en el genoma de levadura como parte de Ty1 o como elementos aislados. Sin embargo estas secuencias están concentradas en regiones genómicas contiguas a los genes tRNA. La

estabilidad de los elementos δ es suficiente para usar esta técnica como método de identificación de cepas vínicas de *S. cerevisiae* a nivel industrial [NESS, F.; LAVELLE, F.; DUBOURDIEU, D.; AIGLE, M. y DULAU, L. (1993). Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J. Sci. Food Agric.* 62: 89-94]. Barros y col. [BARROS LOPES, M.; SODEN, A.; HENSCHKE, P.A. y LANGRIDGE, P. (1996). PCR differentiation of commercial strains using intron splice site primers. *Appl. and Environ. Microbiol.* 62: 4514-4520] también han desarrollado un método basado en PCR cuyos cebadores reconocen zonas repetitivas cercanas a los intrones, las denominadas en inglés "intron splice site sequences". Dicho método se ha aplicado además a otras especies de levaduras presentes durante la vinificación (BARROS LOPES, M.; SODEN, A.; MARTENS, A.L.; HENSCHKE, P.A. y LANGRIDGE, P. (1998). Differentiation and species identification of yeast using PCR. *Inter. J. of Syst. Bacteriol.* 48: 279-286). Sin embargo, aunque estas dos técnicas sirven para determinar polimorfismos entre cepas de la misma especie, presentan problemas relativos a la falta de reproducibilidad de los resultados, siendo necesario que todas las condiciones de amplificación estén estandarizadas para conseguir resultados comparables. Un problema adicional lo constituye el hecho de que las diferencias se deben a variaciones en la intensidad de las bandas, y estas no se pueden tener en cuenta ya que son debidas a amplificaciones no reproducibles como resultado de uniones inespecíficas de los cebadores al usar temperaturas bajas en el anillamiento durante la amplificación por PCR [CROWHURST, R.N.; HAWTHORNE, B.T.; RIKKERINK, E.H.A. y TEMPLETON M.D. (1991). Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *Cucurvitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. *Curr. Genet.* 20: 391-396].

Hay diversas aplicaciones moleculares para identificar hongos filamentosos de los géneros *Colletotrichum*, *Fusarium* y *Penicillium*, utilizando la zona ribosomal [EDEL, V.; STEINBERG, C.; GAUTHERON, N. y ALUBOUVETTE, C. (1996). Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR) amplified ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species. *Micol. Res.* 101: 179-187; SEQUERRA, J.; MARMEISSE, R.; VALLA, G.; NORMAND, P.; CAPELLANO, A. y MOIROUD, A. (1997). Taxonomic position and intraspecific variability of the nodule forming *Penicillium nodositatum* inferred from RFLPs analysis of the ribosomal intergenic spacer and Random Amplified Polymorphic DNA. *Mycol. Res.* 101: 465-472; BUDDIE, A.G.; MARTINEZ-CULEBRAS, P.; BRIDGE, P.D.; GARCIA, M.D.; QUEROL, A.; CANNON, P.F. y MONTE E. (1999). Molecular characterization of *Colletotrichum* strains derived from strawberry. *Mycological Res.* 103: 385-394]. Sin embargo, para diferenciar a nivel de cepa tan sólo se ha aplicado el análisis de restricción del mtDNA [BUDDIE, A.G.; MARTINEZ-CULEBRAS, P.; BRIDGE, P.D.; GARCIA, M.D.; QUEROL, A.; CANNON, P.F. y MONTE E. (1999). Molecular characterization of *Colletotrichum* strains derived from strawberry. *Mycological Res.* 103: 385-394] o RAPDs [ASSIGBETSE, K.B.; FERNANDEZ, D.; BUBOIS, M.P. y GEIGER, J.P. (1994). Differentiation of *Fusarium oxysporum* s.p. *vasinfectum* races on cotton by random amplified DNA (RAPD) analysis. *Phytopathology* 84:622-626; BUDDIE, A.G.; MARTINEZ-CULEBRAS, P.; BRIDGE, P.D.; GARCIA, M.D.; QUEROL, A.; CANNON, P.F. y MONTE E. (1999). Molecular characterization of *Colletotrichum* strains derived from strawberry. *Mycological Res.* 103: 385-394; NICHOLSON, P y REZANOOR, H.N. (1994). Use of polymerase chain reaction-amplified ribosomal intergenic sequences for the diagnosis of *Verticillium tricorpus*. *Micol. Res.* 98: 13-21].

En resumen, a pesar de que durante los últimos años se ha avanzado considerablemente, aun no existe un método definitivo que permita identificar cepas de levaduras y hongos filamentosos de una forma rápida y reproducible. La presente invención sugiere el desarrollo de un método reproducible, rápido y sensible para diferencias cepa de *S. cerevisiae* que es extrapolable a otras especies levaduriformes y fúngicas.

Descripción de la invención

Como se mencionó previamente, los distintos tamaños entre mtDNA de diferentes cepas de *S. cerevisiae* son el resultado de la presencia variable de algunos intrones y de variaciones de tamaño en las regiones intergénicas. El gen mitocondrial COX1 posee siete intrones y ocho exones. Los intrones son zonas no codificantes que permiten que se acumulen mutaciones frente a los exones que son zonas codificantes y muy conservadas. La Figura 1 muestra un análisis *in silico* de la variabilidad en el número de intrones y en su posición en el gen COX1 de diferentes especies fúngicas y levaduriformes, indicando un grado de variabilidad suficiente para diferenciar a nivel de cepa. La presente solicitud de invención consiste en la utilización de doce cebadores diseñados tomando como base A secuencia de exones, que amplifican los intrones permitiendo caracterizar cepas de levaduras y hongos filamentosos. La estructura del gen, así como los cebadores motivo de la presente patente se muestran en la Figura 2.

Este método se puede aplicar sobre una preparación de DNA total, una colonia aislada en una placa de cultivo, o una muestra obtenida en la industria o en la clínica, entre otras, y forman parte de la

presente invención. La técnica desarrollada es simple y es accesible a cualquier laboratorio con experiencia limitada en métodos moleculares. Es posible manipular hasta 50 muestras (dependiendo de las características del termociclador) y es altamente satisfactoria en términos de velocidad de ejecución (5 a 6 horas). Esta técnica es importante para cualquier industria de fermentación que precise garantizar la imposición de su microorganismo a lo largo del proceso industrial. A modo de ejemplo, este método se podría aplicar en el seguimiento de levaduras vínicas a lo largo de la fermentación alcohólica, en la búsqueda de contaminantes en alimentos o bebidas o en la identificación y caracterización de patógenos de interés clínico o veterinario.

10 Descripción de las figuras

Figura 1. Esquema de la estructura física del gen COX1 en distintas especies de levaduras y hongos filamentosos.

Figura 2. Esquema de la estructura física del gen COX1 en *Saccharomyces cerevisiae* y la secuencia de los cebadores motivo de la presente invención, así como la zona donde se unen los mismos.

Figura 3. Patrones obtenidos al amplificar por PCR las zonas variables del gen COX1 en 34 cepas comerciales de la especie *Saccharomyces cerevisiae* descritas en la Tabla 1. El marcador molecular (m) es el 100 pb DNA ladder de Gibco-BRL.

Figura 4. Seguimiento de las fermentaciones de laboratorio realizadas con mosto Bobal inoculado con las levaduras vínicas: (1) T73, (2) CECT 1881, (3) Fermol complet killer, (4) CECT 1484, en la proporción que se indica sobre cada panel. Para cada vinificación a la derecha del patrón molecular (m: 100 pb DNA ladder de Gibco-BRL) aparecen los análisis correspondientes a la amplificación por PCR de COX1 de las muestras y a la izquierda el control positivo de la reacción de PCR usando los cebadores que amplifican el gen 5,8S rRNA y los espaciadores intergénicos ITS1 e ITS2.

Figura 5. Seguimiento a lo largo de las fermentaciones con las levaduras T73 y L2056 y la variedad Tempranillo para elaborar vinos tintos. Para cada vinificación a la derecha del patrón molecular (m: 100 pb DNA ladder de Gibco-BRL) aparecen los datos correspondientes a la amplificación por PCR de COX1 de las muestras y a la izquierda el control positivo de la reacción de PCR usando los cebadores que amplifican el gen 5,8S rRNA y los espaciadores intergénicos ITS1 e ITS2.

Figura 6. Seguimiento a lo largo de las fermentaciones con las levaduras K1 y ALB y la variedad Macabeo para elaborar vinos blancos. Para cada vinificación a la derecha del patrón molecular (m: 100 pb DNA ladder de Gibco-BRL) aparecen los datos correspondientes a la amplificación por PCR de COX1 de las muestras y a la izquierda el control positivo de la reacción de PCR usando los cebadores que amplifican el gen 5,8S rRNA y los espaciadores intergénicos ITS1 e ITS2.

Figura 7. Caracterización de tres aislados pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae* procedentes de biopsias de distintos pacientes. El marcador de peso molecular (m) es el 100 pb DNA ladder de Gibco-BRL.

Figura 8. Caracterización a nivel de cepa de cinco aislados pertenecientes a las especies patógenas *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis*. El marcador de peso molecular (m) es el 100 pb DNA ladder de Gibco-BRL.

Figura 9. Caracterización de distintas especies de hongos filamentosos pertenecientes el los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. El marcador de peso molecular (m) es el 100 pb DNA ladder de Gibco-BRL.

Los ejemplos que siguen son significativos del presente invento y no deben ser considerados como limitativos.

Ejemplo 1

Desarrollo de una técnica para la caracterización de cepas de levaduras comerciales. Detección de fraudes en la producción de iniciadores comerciales

Como hemos comentado en los antecedentes, muchas levaduras se utilizan en la industria como cultivos iniciadores. Su caracterización es muy importante para determinar posibles contaminaciones durante la elaboración en forma de levadura seca activa, o incluso determinar posible fraudes por parte de los distribuidores.

Para confirmar la utilidad del método desarrollado de amplificación por PCR del gen COX1 y su posible aplicación en la caracterización de levaduras, se amplificaron 34 levaduras vínicas comerciales (Tabla 1), que habían sido caracterizadas previamente usando otros marcadores moleculares como análisis de restricción del mtDNA, cariotipos y amplificación por PCR de los elementos δ (resultados sin publicar).

5 Para comprobar la reproducibilidad de los resultados se realizó la amplificación de las levaduras comerciales por duplicado a partir de diferentes extracciones de DNA total siguiendo el protocolo descrito por Querol y cols. [QUEROL, A.; BARRIO, E. y RAMON, D. (1992b). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. Syst. Appl. Microbiol. 15: 439-446].

10 En el presente ejemplo la diferencia más relevante respecto a la descripción general de la técnica es que con sólo cuatro cebadores se diferenciaron todos los aislados analizados. Los cebadores utilizados fueron COX34L, COX34R, COX5L y COX6R (las secuencias aparecen en la Figura 2). El DNA obtenido por cualquier método de extracción se sometió a una reacción de PCR tal y como se describe a continuación. La mezcla final de la reacción contuvo 10 mM Tris Cl pH 8.8 a 25°C; 1.5 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 0.1 %
15 (p/v) Triton X-100; 0.2 mM dATP; 0.2 mM dGTP; 0.2 mM dCTP; 0.2 mM dTTP; 0.1 μ M de cada cebador y 0.2 unidades de Taq polimerasa. Las condiciones de la reacción de PCR fueron 95°C durante 5 minutos y 35 ciclos de 95°C durante 1 minuto y medio, 52°C durante 2 minutos y medio, 72°C durante 3 minutos y medio, y un último paso de 72°C durante 10 minutos. Dichas condiciones son válidas para distintos termocicladores (todos los modelos de las marcas Techne, Eppendorf o Perkin Erlmer). Las
20 reacciones se analizaron en un gel de agarosa al 1,4% (p/v) observándose unas bandas que permitieron identificar y diferenciar las cepas comerciales de *Saccharomyces cerevisiae*.

Los resultados indicaron la existencia de un fraude comercial, ya que de las treinta y seis levaduras comerciales correspondientes a ocho distribuidores se detectaron diecinueve cepas con diferentes nombres
25 comerciales que no presentaron un patrón único (Figura 3). Estos resultados coinciden con los previamente obtenidos utilizando otros marcadores moleculares (análisis de restricción del mtDNA, cariotipos y análisis de los elementos δ).

Ejemplo 2

30 *Detección directa de levaduras a partir de productos fermentados*

Como hemos visto en el ejemplo anterior, mediante amplificación por PCR de fragmentos del gen COX1 es posible caracterizar diferentes levaduras de interés industrial. Sin embargo, resulta interesante
35 saber la sensibilidad de la técnica para poder ser utilizada en la industria. En este ejemplo se realizaron fermentaciones inoculando mosto con cepas vínicas comerciales de *S. cerevisiae* en distintos porcentajes.

Se utilizaron las levaduras vínicas T73, CECT 1881, Fermol complet killer y CECT 1484 cuyos patrones de amplificación de COX1 se muestran en la Figura 3. Las cepas Fermol complet killer y CECT
40 1484 se inocularon en todos los casos en un porcentaje del 10% mientras que las cepas T73 y CECT 1881 variaron desde un 10% hasta un 70% dependiendo de la fermentación, tal y como se indica en la Figura 4. En todos los casos se inocularon 900 ml de mosto estéril de uva de la variedad Bobal.

Para monitorizar la dinámica de las cepas inoculadas se tomaron muestras a diferentes tiempos, al
45 principio de la fermentación, en la fase tumultuosa y al finalizar la fermentación. Para cada muestra se tomó 1 ml a lo largo de los siguientes días:

Día 0: mosto sin inocular

50 Día 1-2: al empezar la fermentación tumultuosa

Día 6-7: al finalizar la fermentación tumultuosa

55 Día 9-10: cuando la mayoría de los azúcares habían sido degradados.

Para caracterizar las levaduras se aplicó la técnica descrita en el ejemplo 1. La muestra que se sometió al análisis no fue DNA aislado, sino levaduras obtenidas por centrifugación de muestras de vino. En la
Figura 4 se muestran los resultados obtenidos al amplificar por PCR el gen COX1 en las vinificaciones realizadas con mosto Bobal. Cuando la proporción de la cepa de levadura inoculada fue del 70% se
60 detectó el patrón de esta cepa desde el primer día, manteniéndose sin variaciones hasta el último día de muestreo. No se detectaron el resto de las cepas inoculadas en un 10%. Cuando el porcentaje de las levaduras fue del 50% y del 30%, ambos patrones se detectaron. El resto de la figura muestra otros

experimentos variando las concentraciones entre un 10% y un 50%. En resumen, utilizando muestras directas es posible determinar la imposición o presencia de levaduras inoculadas en porcentajes superiores o iguales al 30%.

5 Ejemplo 3

Uso de la técnica descrita en el ejemplo 1 para seguir la imposición del iniciador microbiano durante la fermentación industrial

10 En cualquier industria de fermentación, y sobre todo en aquellas donde el medio de cultivo no es estéril como es el caso de la vinificación, es muy interesante comprobar que a lo largo de la fermentación el microorganismo inoculado se impone al resto de la flora y, sobre la base de su superioridad numérica dirige la fermentación. Para poder seguir la implantación de la cepa inoculada es necesario poder diferenciarla del resto de microorganismos presentes a lo largo de la fermentación. En el caso de la vinificación, este trabajo se complica, ya que, tanto la levadura inoculada como la mayoría de levaduras del mosto pertenecen a la especie *S. cerevisiae*. En este ejemplo se estudiaron cuatro fermentaciones vnicas llevadas a cabo en unas bodegas industriales con 4 cepas comerciales distintas, dos de ellas (T73 y L2056) implicadas en la elaboración de vinos tintos y las otras dos (K1 y ALB) en la producción de vinos blancos. La metodología utilizada es la descrita en el ejemplo 1 pero con la excepción de añadir 5 µg de seroalbúmina (BSA) en la reacción de PCR. En la Figura 5 se muestra un seguimiento a lo largo de las fermentaciones con la variedad Tempranillo para elaborar vinos tintos y en la Figura 6 con la variedad Macabeo, para elaborar vinos blancos. Tal y como se puede observar las cuatro levaduras comerciales se impusieron en porcentajes superiores al 30% desde el primer día de la fermentación.

25 Ejemplo 4

*Uso de la técnica descrita en el ejemplo 1 para diferenciar aislados de interés clínico pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae**

30 Como ejemplo de la posible aplicación clínica del método objeto de patente se muestran los resultados de la caracterización de tres aislados pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae* procedentes de las vías respiratorias de tres pacientes aquejados de traumatismo craneal (aislado 1), trasplante pulmonar (aislado 2) y candidiasis esofágica (aislado 3) respectivamente. Tal y como se puede observar en la Figura 7, cada aislado presenta un patrón único identificativo de cepa.

35 Ejemplo 5

*Uso de la técnica descrita en el ejemplo 1 para diferenciar aislados de interés clínico pertenecientes al género *Candida**

40 Las especies *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis*, son especies típicamente patógenas y su identificación y detección rápida resulta de gran interés hospitalario para poder determinar el origen de la infección. En la Figura 8 se muestran la identificación y caracterización a nivel de cepa de 5 aislados pertenecientes a estas especies que fueron obtenidos a partir de cinco pacientes aquejados de micosis interdigital (CECT 1002), micosis bronquial (CECT 1394), micosis por inmunodepresión (1427), endocarditis (CECT 1436) o la enfermedad tropical conocida como esprue (CECT 1449) respectivamente. Tal y como se puede observar en la Figura 8, cada aislado presenta un patrón único identificativo de cepa.

Ejemplo 6

50 *Uso de la técnica descrita en el ejemplo 1 con otros microorganismos eucariotas*

Otra posible aplicación de la técnica descrita en esta memoria es la caracterización de hongos filamentosos, unos microorganismos de relevancia industrial por producir enzimas de interés agroalimentario (algunas especies del género *Aspergillus*) o ser responsables de enfermedades o alteraciones de un gran número de alimentos y frutas (especies del género *Penicillium*). En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos utilizando la técnica propuesta en la presente invención para caracterizar tres especies del género *Aspergillus* y una del género *Penicillium*. Como se puede observar, los patrones obtenidos son únicos e identificativos de especies.

60

ES 2 188 335 B1

TABLA 1

Lista de cepas vínicas comerciales empleadas en el ejemplo 1

	Denominación	Variedad	Casa comercial
5	Vitilevure Pris Mouse	S. bayanus	Martin Vialatte
	Uvaferm CEG	S. cerevisiae	Danstar
10	Uvaferm UVA	S. uvarum	Danstar
	Uvaferm CM	S. cerevisiae	Danstar
	Uvaferm VRB	S. cerevisiae	Danstar
	Lalvin EC1118	S. bayanus	Lallemand
15	Fermivin VB1	S. cerevisiae	Gist Brocades
	Fermichamp 67J	S. bayanus	Gist Brocades
	Cryoaromae	S. cerevisiae	AEB Iberica S.A.
	Fermivin crio 7303	S. cerevisiae	AEB Iberica S.A.
20	Uvaferm Alb	S. cerevisiae	Danstar
	Levuline tirage agglo	Sin especificar	GLO Group Lab
	Lalvin DV10	S. bayanus	Lallemand
	Lalvin T73	S. cerevisiae	Lallemand
	Maurivin	S. bayanus	Pris Mousse Biostar
25	Uvaferm C.S. 2049	S. cerevisiae	Danstar
	Uvaferm L2056	S. cerevisiae	Danstar
	Uvaferm PM	S. cerevisiae	Danstar
	Uvaferm UCD522	S. cerevisiae	Danstar
	Uvaferm P29	S. cerevisiae	Danstar
30	Fermicru VB1	S. cerevisiae	Gist Brocades
	Lalvin D47	S. cerevisiae	Lallemand
	Boeroferm W	S. cerevisiae	Lallemand
	UCLM S235	S. cerevisiae	Springer Oenologie
35	Zymaflore VL3	S. cerevisiae	Lallemand
	Zymaflore VL1	S. cerevisiae	Lallemand
	D254	S. cerevisiae	Lallemand
	Levuline CHP	S. bayanus	GLO Group Lab
40	Fermicru VR5	S. cerevisiae	Gist Brocades
	Uvaferm RA17	S. bayanus	Danstar
	K1	Sin especificar	Lallemand
	Oenopnox	Sin especificar	*
45	Fermol Primeur	S. cerevisiae	AEB Iberica S.A.
	Fermol Reims Champagne	S. bayanus	AEB Iberica S.A.

* Cepa proporcionada por el Instituto Catalán de la Viña y el Vino (INCAVI).

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de identificación de cepas y/o especies de levaduras y hongos filamentosos basado en la amplificación de una zona variable del DNA mitocondrial **caracterizado** por las siguientes etapas:

- amplificación del DNA mediante una reacción de PCR que comprende al menos una muestra del DNA a identificar y una determinada selección de cebadores específicos del gen COX, y
- diferenciación y caracterización de la cepa y/o especie a partir del patrón específico de bandas de DNA amplificadas.

2. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el DNA se obtiene por cualquier método estándar de extracción.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque no requiere extracción de DNA y la reacción de PCR se puede realizar tomando una muestra de DNA a partir de una colonia aislada.

4. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque no requiere extracción de DNA y la reacción de PCR se puede realizar tomando una muestra de DNA directamente a partir de una muestra biológica sin aislar colonias, entre otras, de un alimento, bebida y aislado clínico.

5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4 **caracterizado** porque a la reacción de PCR se añade la proteína seroalbúmina de cualquier origen biológico.

6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 5 **caracterizado** porque los cebadores específicos del gen COX se seleccionan del siguiente grupo:

COX1L	ATCATTAGATTAGARTTAGCYGC
COX1R	GAAAATGATTAATACNATG
COX2L	GGTCATGCTGTATTAATRATTTT
COX2R	ACCTCCAATTAAAGCNGGCAT
COX34L	GCMAATTGGWGGWMGG
COX34R	ATTGTCATACCATTTGTYCTYAT
COX5L	GAAGTAGCAGGWGGWGGWGA
COX5R	AATCCTACAATATAYATRTGRTG
COX6L	ATGTATATTGTAGGATTRGAYGC
COX6R	GTTAGCTAAGGCWACWCCWGT
COX7L	GCCTCATTAGATGTRGCATTYC
COX7R	CTGCGAAAGCATCAGGRTARTC

7. Procedimiento según la reivindicación 6 **caracterizado** porque los cebadores específicos del gen que COX son:

COX34L, COX34R, COX5L Y COX6R

8. Procedimiento según la reivindicación 1 a la 7 **caracterizado** porque las cepas y/o especies de levaduras y hongos filamentosos son de interés, industrial, clínico o de cualquier otra índole.

9. Procedimiento según la reivindicación 1 a la 8 **caracterizado** porque las cepas y/o especies de levaduras y hongos filamentosos son entre otros: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. Bayanus*, *S. Uvarun*, *C. Albicans*, *C. Parapsilosis*, *Tropicalis*, *Aspergillus* y *Penicillium*.

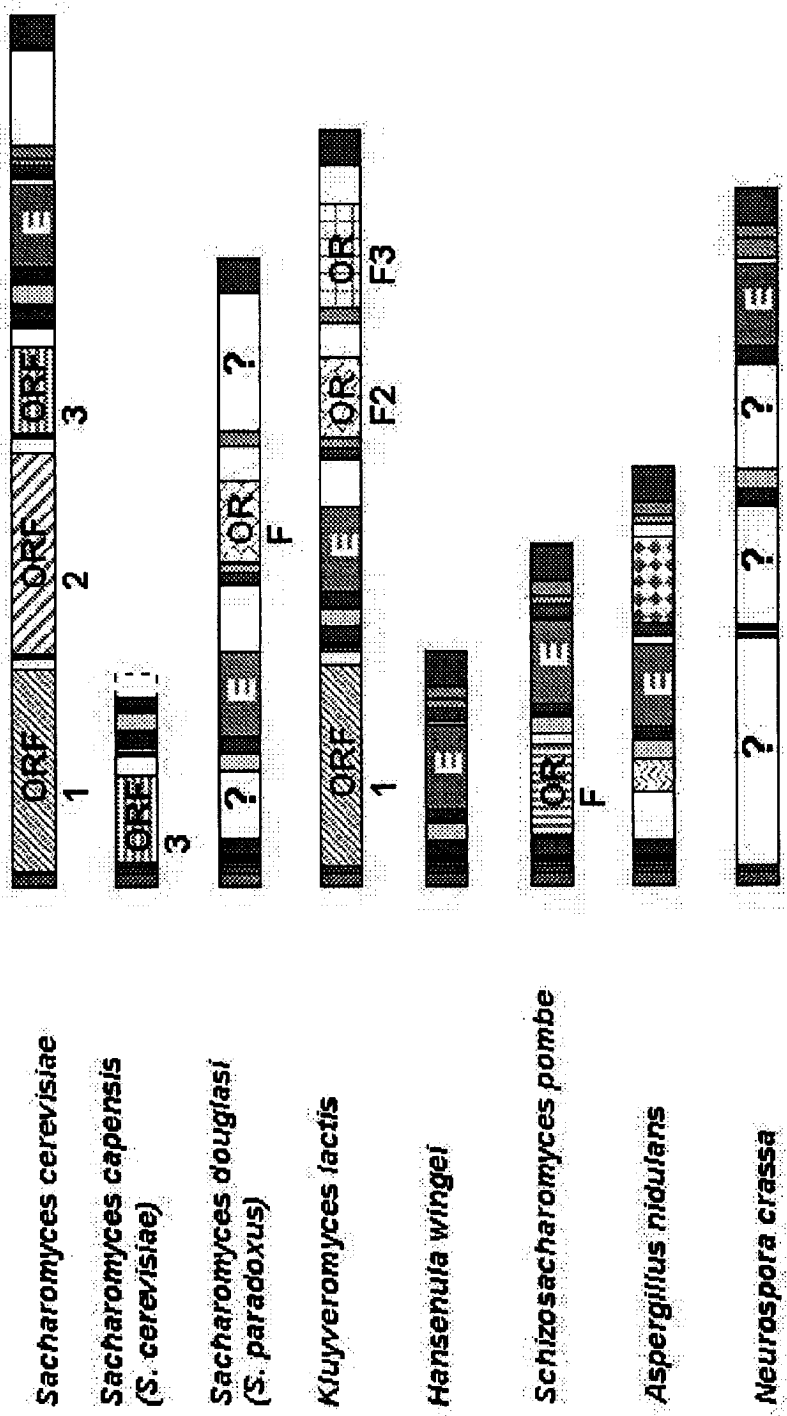


Figura 1

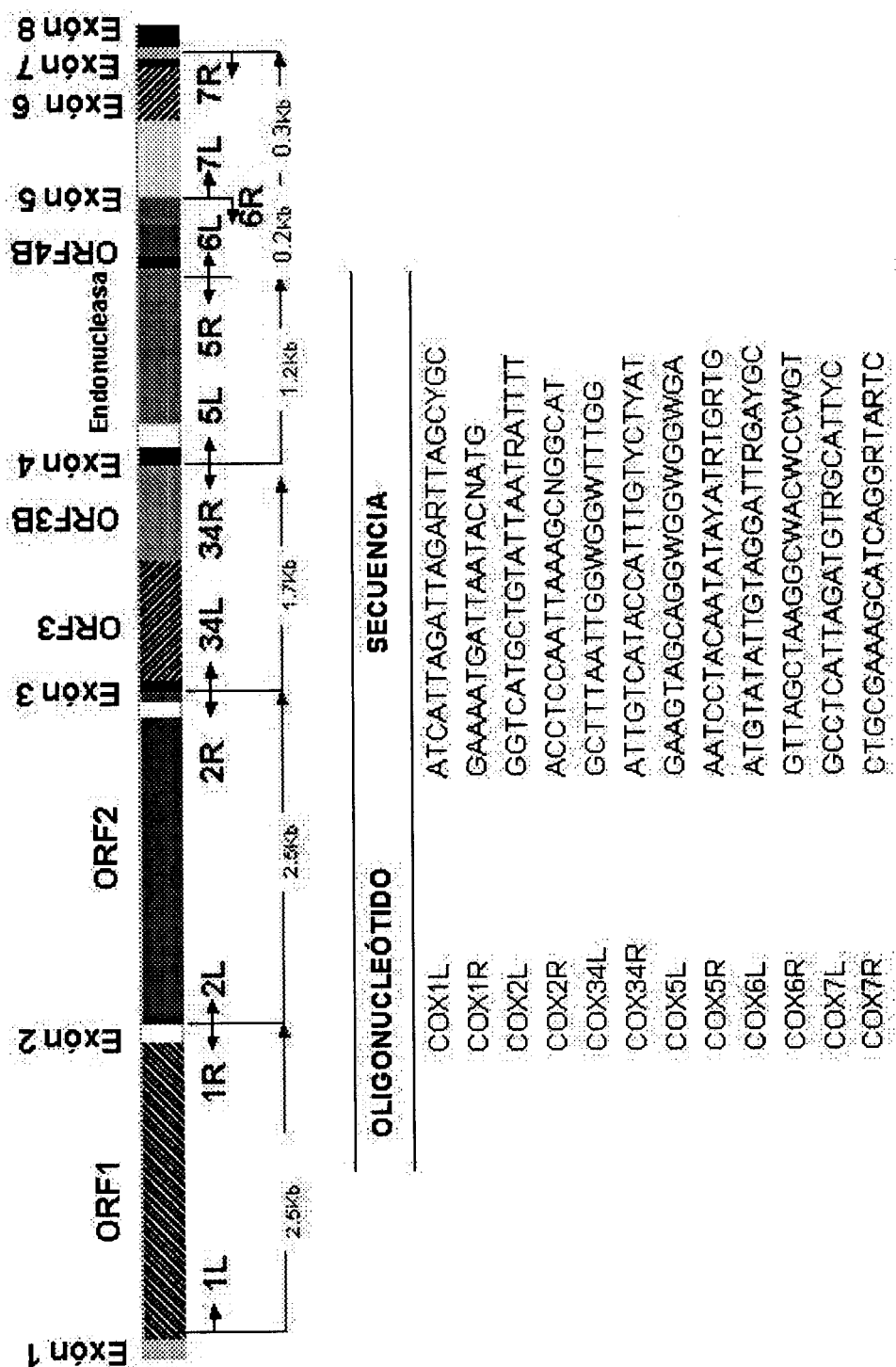


Figura 2

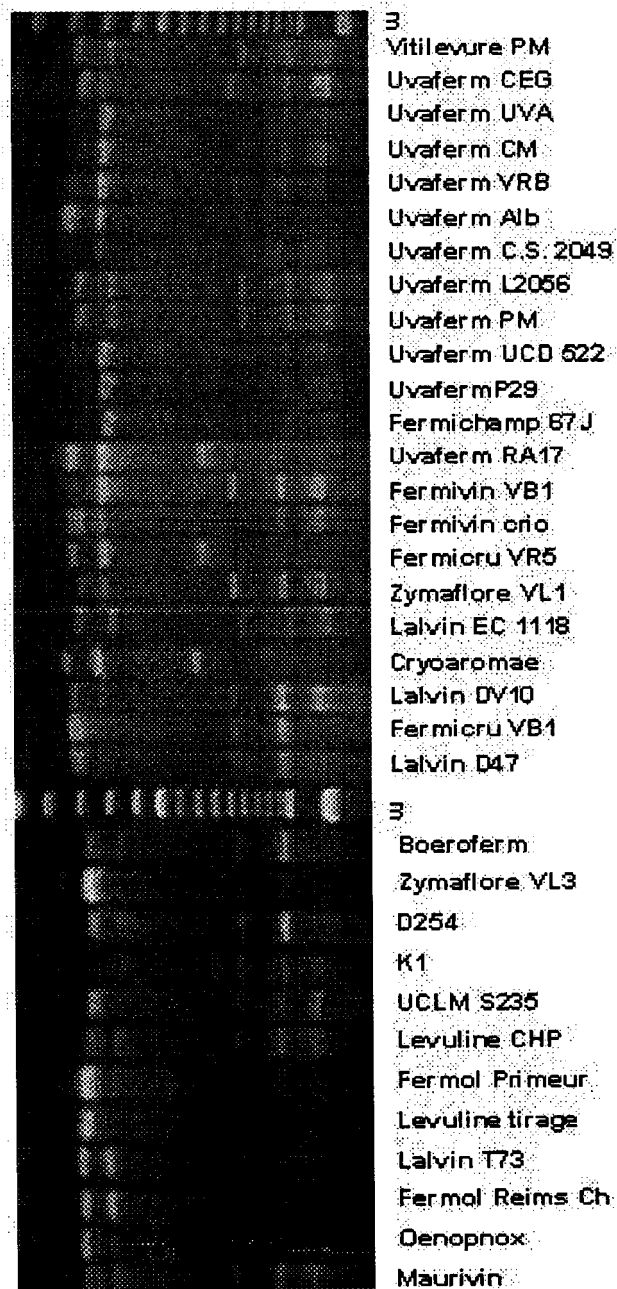


Figura 3

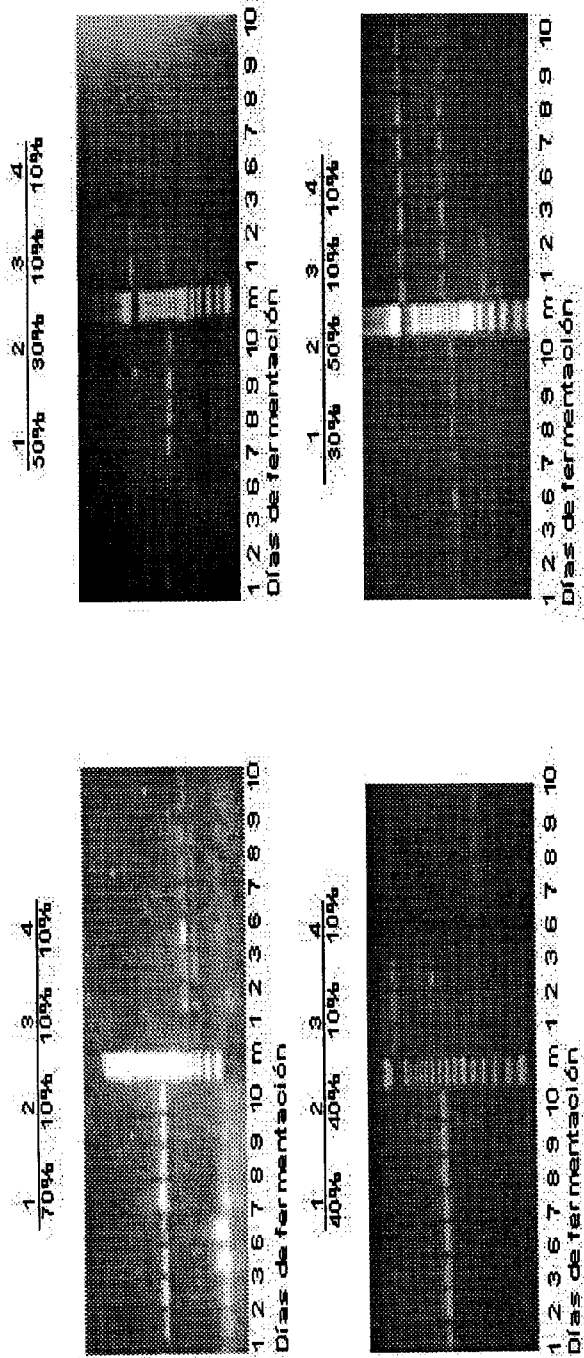
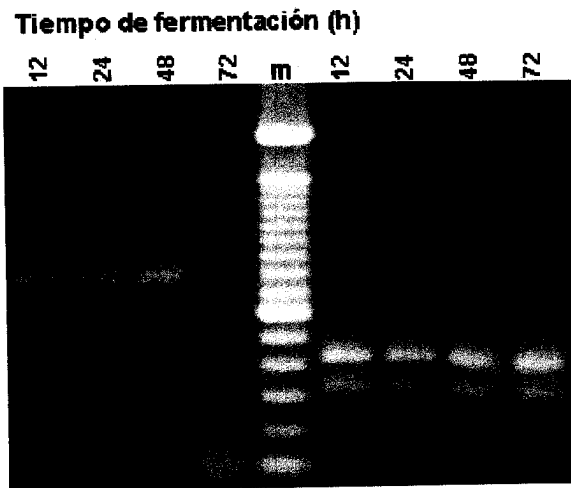


Figura 4

T73



L 2056

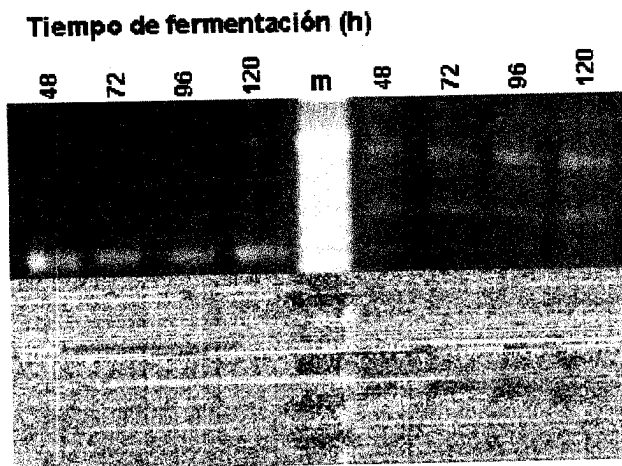
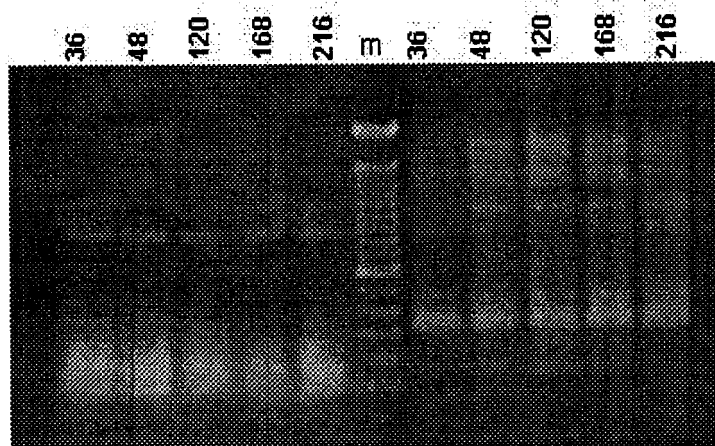


Figura 5

K1

Tiempo de fermentación (h)



ALB

Tiempo de fermentación (h)

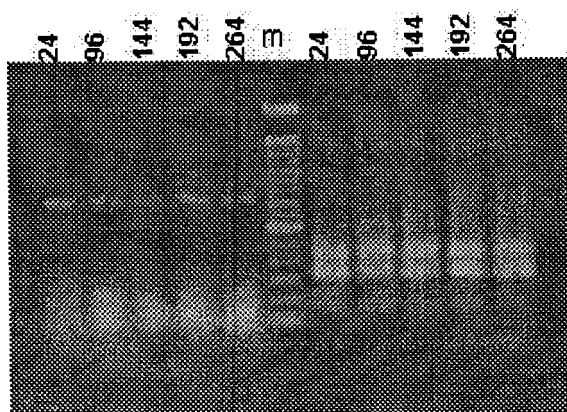


Figura 6

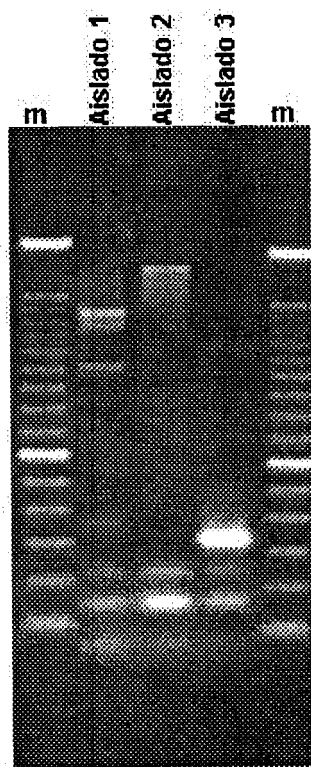


Figura 7

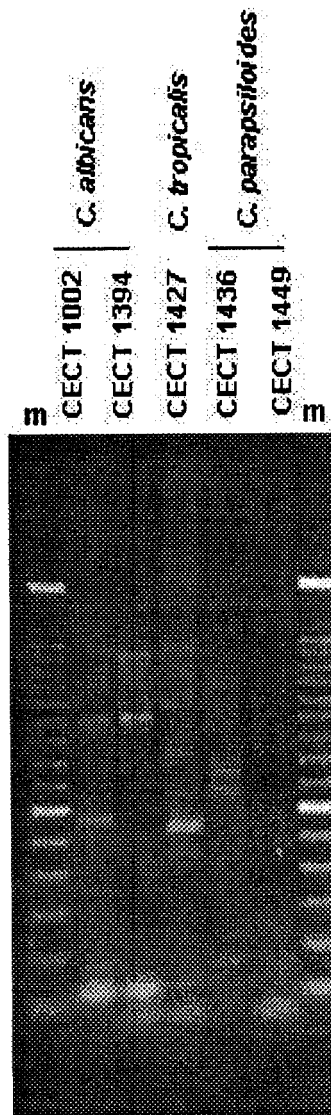


Figura 8

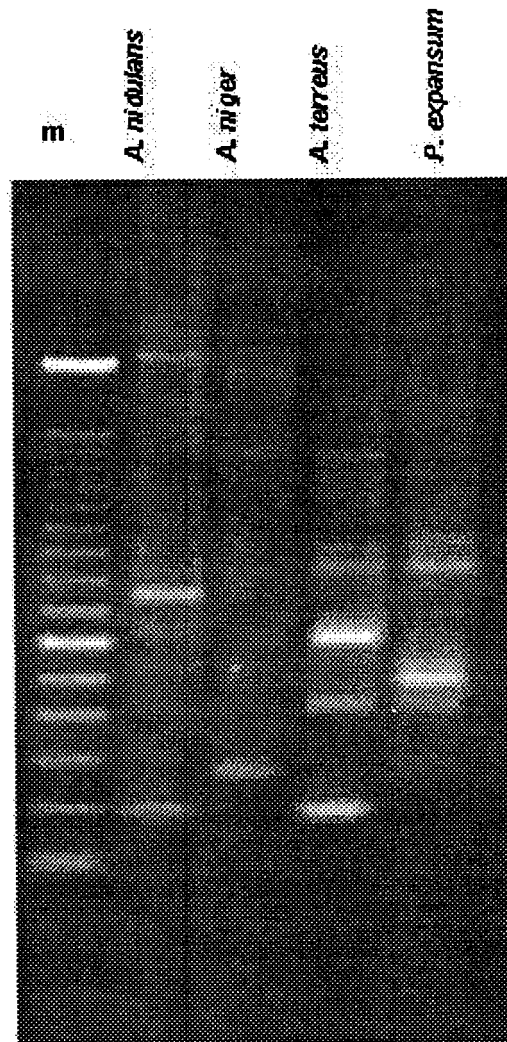


Figura 9

ES 2 188 335 B1

LISTAS DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

5 <120> PROCEDIMIENTO PARA LA DIFERENCIACION DE MICROORGANISMOS EUCARIOTAS
BASADO EN LA AMPLIFICACION POR PCR DE ZONAS VARIABLES DEL DNA MITOCON-
DRIAL

<130> amplificación de DNA

10 <160> 12

<170> PatentIn version 3.1

15 <210> 1
<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

20 <220>

<223> Oligonucleotido COX1L

<400> 1

atcattagat tagarttagc ygc

23

25 <210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

30 <220>

<223> Oligonucleotido COX1R

<400> 2

gaaaatgatt aatacnatg

19

35 <210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

40 <220>

<223> Oligonucleotido COX2L

<400> 3

45 ggtcatgctg tattaarat ttt

23

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

50 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotido COX2R

55 <400> 4

acctccaatt aaagcngca t

21

<210> 5

<211> 20

60 <212> DNA

<213> Artificial sequence

ES 2 188 335 B1

	<220>		
	<223> Oligonucleotido COX34L		
	<400> 5		
5	gctttaattg gwggwtttgg		20
	<210> 6		
	<211> 23		
	<212> DNA		
10	<213> Artificial sequence		
	<220>		
	<223> Oligonucleotido COX34R		
	<400> 6		
15	attgtcatac catttgtyct yat		23
	<210> 7		
	<211> 20		
20	<212> DNA		
	<213> Artificial sequence		
	<220>		
	<223> Oligonucleotido COX5L		
25	<400> 7		
	gaagtagcag gwggwggwga		20
	<210> 8		
30	<211> 23		
	<212> DNA		
	<213> Artificial sequence		
	<220>		
35	<223> Oligonucleotido COXSR		
	<400> 8		
	aatcctacaaa tatayartg rtg		23
40	<210> 9		
	<211> 23		
	<212> DNA		
	<213> Artificial sequence		
45	<220>		
	<223> Oligonucleotido COX6L		
	<400> 9		
	atgtatattg taggattrga ygc		23
50	<210> 10		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> Artificial sequence		
55	<220>		
	<223> Oligonucleotido COX6R		
	<400> 10		
60	gtttagctaag gcwacwccwg t		21
	<210> 11		

ES 2 188 335 B1

<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence

5 <220>
<223> Oligonucleotido COX7L

<400> 11
gcttcattag atgtrgcatt yc 22

10 <210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence

15 <220>
<223> Oligonucleotido COX7R

20 <400> 12
ctgcgaaagc atcaggrtar tc 22

25

30

35

40

45

50

55

60



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 188 335

② Nº de solicitud: 200002425

③ Fecha de presentación de la solicitud: 06.10.2000

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12Q 1/68, C12N 15/31

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 0860503 A (SS. PHARMACEUTICAL CO., LTD) 26.08.1998	1-9
A	NAKAGAWA, Y. et al. "Amplification and sequencing of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit II gene for phylogenetic analysis of yeast". INSTITUTE FOR FERMENTATION RESEARCH COMMUNICATIONS, 1997, Nº 18, páginas 52-56.	1-9

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

14.05.2003

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/1