



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 197 813**  
(21) Número de solicitud: 200201048  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **C12N 15/10**

(12)

PATENTE DE INVENCIÓN

B1

(22) Fecha de presentación: **07.05.2002**  
(43) Fecha de publicación de la solicitud: **01.01.2004**  
Fecha de la concesión: **28.12.2004**  
(45) Fecha de anuncio de la concesión: **01.02.2005**  
(45) Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**01.02.2005**

(73) Titular/es: **Universidad de Málaga**  
**Plaza de El Ejido s/n**  
**29071 Malaga, ES**  
  
(72) Inventor/es: **Torre Fazio, Fernando de la**;  
**Claros Díaz, Gonzalo y**  
**Cánovas Ramos, Francisco**  
  
(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **Procedimiento para la caracterización de aceites y grasas de origen vegetal mediante la utilización de marcadores moleculares de ADN.**

(57) Resumen:

Procedimiento para la caracterización de aceites y grasas de origen vegetal mediante la utilización de marcadores moleculares de ADN.

Se presenta un procedimiento que permite la determinación varietal y específica de una forma fiable a partir de muestras de aceites y grasas de origen vegetal (refinados y no refinados), mediante la extracción del ADN y la posterior utilización de marcadores moleculares de ADN basados en la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

La naturaleza de este método permite su aplicación a cualquier aceite o grasa de origen vegetal independientemente de que haya sido fabricado a partir de una única variedad o de varias variedades de una misma especie, o de la mezcla de distintas especies vegetales. La técnica que se expone en esta patente tiene gran importancia en las certificaciones de calidad y en los controles de fraudes por adulteración.

ES 2 197 813 B1

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

## DESCRIPCION

Procedimiento para la caracterización de aceites y grasas de origen vegetal mediante la utilización de marcadores moleculares de ADN.

### Sector de la técnica

El presente procedimiento tiene su aplicación en la industria alimentaria (de especial incidencia en España es la olivarera) que desee identificar, certificar y seleccionar los aceites producidos. Podría usarse esta herramienta como apoyo a denominaciones de origen para aceites de oliva. Tiene también esta técnica aplicación como sistema de control de aceites fabricados fraudulentamente mediante la adulteración con aceites de distinta procedencia a aquella con la que es comercializado.

### Estado de la técnica

Actualmente no existe ningún sistema para la certificación varietal o específica de aceites de origen vegetal basadas en el ADN. Las técnicas existentes en la actualidad para hacer este tipo de certificaciones están basadas en la presencia o ausencia de otros compuestos químicos tales como ácidos grasos o tocoferoles. Estos métodos son altamente complejos y costosos y no ofrecen un grado de fiabilidad satisfactorio.

Los criterios utilizados actualmente para detectar mezclas de aceites de distintas especies, ya sean fraudulentas o legales, se realizan igualmente mediante la determinación de la presencia o ausencia de determinados compuestos químicos. También se utilizan otras metodologías basadas en la distinción de propiedades físicas.

Existen en la actualidad estudios que han conseguido diferenciar variedades de olivos y de otras especies vegetales atendiendo a su ADN mediante la utilización de diversos marcadores moleculares como RAPD, SCAR, EST o SSR. Estos estudios siempre se han llevado a cabo a partir de tejidos de la planta como hojas y frutos y no a partir de los aceites obtenidos de estas especies.

En la presente patente se presenta por primera vez un sistema basado en la utilización de marcadores moleculares de ADN como criterio fiable, rápido y barato para la determinación de las variedades y especies vegetales utilizadas para la fabricación de aceites de origen vegetal.

### Explicación

La patente que se propone es el procedimiento para la identificación de las variedades y especies vegetales utilizadas en la fabricación de aceites vegetales mediante la utilización de marcadores moleculares de ADN basados en polimorfismos descritos en el genoma de estas variedades y especies. Se trata de utilizar marcadores individuales o grupos de marcadores de ADN que permitan la certificación de origen y fabricación de aceites vegetales en aceites monovarietales, monoespecíficos o mezclas de variedades y/o especies vegetales.

### Explicación detallada de un modo de realización

El sistema para llevar a cabo los estudios de determinación objeto de la presente patente se lleva a cabo en sucesivas fases que se describen a continuación como un modo de realización de la invención:

1. *Obtención de ADN a partir de muestras de aceites vegetales como: aceite de oliva en sus distintas calificaciones, y aceites de semillas (girasol, maíz, etc. ...)*

La metodología propuesta en esta patente para obtener ADN de las muestras anteriormente señaladas consiste en la emulsión de una cantidad de 20 mililitros de una solución de tris 100 mM, 10 mM de EDTA (etilen diamino tetraacetato) y 0,1% p/v de ácido ascórbico con una cantidad de 100 gramos de la muestra de aceite objeto de la extracción. La emulsión se realiza con gran agitación durante 60 minutos a temperatura ambiente (en torno a 20°C). La emulsión es posteriormente centrifugada a 36.000 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Durante esta centrifugación se forma una doble capa de manera que la fase apolar (aceite) se sitúa en la parte superior y en la parte inferior se dispone la fase polar (la solución antes descrita).

Mediante la utilización de una pipeta estéril se toma la capa superior que es descartada a continuación. La fase acuosa es reutilizada para emulsionarla de nuevo con una cantidad de 100 gramos de la misma muestra durante 60 minutos a temperatura ambiente e igualmente se repite la centrifugación y posterior eliminación de la fase superior. Este proceso se repite al menos 5 veces de forma que la fase acuosa haya sido emulsionada al menos con una cantidad 500 gramos de la muestra.

La fase acuosa resultante de los anteriores pasos es agitada profusamente durante al menos 10 minutos con una cantidad igual en mililitros de cloroformo. La emulsión resultante de esta mezcla con cloroformo es centrifugada a 10.000 g durante 15 minutos a 15°C. Despues de esta centrifugación, se habrá producido en el tubo una división en dos capas: una superior acuosa y otra inferior apolar constituida básicamente por el cloroformo. La fase superior es colectada y los ácidos nucleicos son precipitados por la adición de dos volúmenes de etanol 100 %, acetato sódico a una concentración final de 300 mM y de 5 a 10 µg de glucógeno. Esta precipitación se realiza a -20°C y debe durar al menos 8 horas.

Transcurrido el tiempo de precipitación, el tubo en el que ha tenido lugar es centrifugado a 35.000 g a 4°C durante 1 hora. Cuando esta centrifugación ha terminado, el sobrenadante es eliminado y el sedimento es resuspendido en un volumen de 500 µl de agua bidestilada estéril.

La solución obtenida de aproximadamente medio mililitro presentará un color oscuro. Esta es tratada con PVP (polivinilpirrolidona) insoluble al 4 % durante 1 hora en un baño a 75-80°C con agitaciones cada 5 minutos. Posteriormente, el tubo contenido esta mezcla es centrifugado a 20.000 g durante 5 minutos a 20°C de manera que los restos de PVP sedimentan en el fondo del tubo y son descartados, quedándonos con la fase acuosa. Si se considera oportuno, esta fase puede repetirse con PVP al 2 %.

Llegados a este punto, si la solución resultante continúa presentando color muy oscuro, deberá ser precipitada en las mismas condiciones de la anterior precipitación y el sedimento tras

ser resuspendido en un volumen de alrededor de 50  $\mu$ l de agua bidestilada estéril será purificado mediante su migración en gel de agaraosa-BrEt y posterior aislamiento de ácidos nucleicos mediante la utilización del kit de *Qiagen Qiaquick Gel Extraction Kit<sup>®</sup>*, según las instrucciones del fabricante, y se dispondrá ya de una muestra suficientemente limpia para poder llevar a cabo ensayos de PCR. En el caso de que la muestra presentara un color menos intenso, se procederá a la limpieza de la muestra mediante la utilización del kit de *Qiagen Qiaquick PCR Purification Kit<sup>®</sup>*, según las instrucciones del fabricante, tras cuya utilización se dispondrá igualmente de una muestra para poder llevar a cabo ensayos de PCR.

El protocolo descrito anteriormente se presenta como un modo de realización de la invención y ésta es igualmente aplicable con variaciones consistentes en modificaciones en los siguientes aspectos:

1. Modificaciones en los tiempos de incubaciones, emulsiones, precipitaciones o centrifugaciones.
2. Modificaciones en la velocidad de las centrifugaciones.
3. Utilización de otros procedimientos para la precipitación de los ácidos nucleicos.
4. Variaciones en las cantidades y proporciones descritas.
5. Sustitución de la extracción con cloroformo por otra equivalente.
6. Cualquier modificación derivada de la utilización de cantidades de muestra o de la solución de emulsión (tris 100 mM, 10 mM de EDTA, 0,1% p/v de ácido ascórbico), que

sean múltiplos o submúltiplos de las anteriormente descritas.

5 7. Cualquier otra modificación que implique una simplificación o complicación del proceso.

10 2. *Caracterización y diferenciación de aceites de oliva y de aceites elaborados a partir de otras especies vegetales*

15 Una vez que se hayan obtenidos las muestras de ADN, se podrá proceder a la caracterización de los distintos tipos de aceites de oliva, así como de otros aceites vegetales, mediante la utilización de marcadores moleculares de ADN basados en la técnica de PCR.

20 La utilización de distintos tipos de marcadores moleculares de ADN como los SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), permitirán diferenciar a los distintos aceites de oliva y a estos de otros aceites vegetales de distinta procedencia (maíz, girasol, avellana,...). El incremento en el número de marcadores moleculares permitirá simplificar y abaratar las determinaciones así como aumentar la fiabilidad en las determinaciones.

25 30 En todos los casos, los ensayos de PCR se han de realizar a un número de ciclos superior a 42 para garantizar la detección a las concentraciones de ADN extremadamente bajas presentes en este tipo de muestras.

35 La separación de los fragmentos amplificados se llevará a cabo en geles de agarosa en presencia de BrEt (Bromuro de etidio) siguiendo método descrito por Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning" editado por Cold Spring Harbor Laboratory Press en New York, 1989. Las reacciones de PCR así como la visualización de los resultados, se llevarán a cabo siguiendo igualmente el Método descrito 40 Sambrook *et al.*

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la caracterización de aceites y grasas de origen vegetal mediante la utilización de marcadores moleculares de ADN basados en polimorfismos descritos en el genoma de las variedades y especies utilizadas en su fabricación, **caracterizado** porque consta fundamentalmente de dos partes, consistiendo la primera parte en una extracción de ADN a partir de los aceites y grasas de origen vegetal y la segunda parte en la detección de los polimorfismos de ADN.

2. Procedimiento según reivindicación 1, **caracterizado** porque la extracción de ADN a partir de aceites y grasas de origen vegetal se lleva a cabo siguiendo los siguientes pasos y en el orden que a continuación se presentan:

1) Emulsión de la muestra de aceite o grasa de origen vegetal objeto de la extracción con una solución acuosa que contenga un agente tamponante y posterior centrifugación hasta que se forma una doble capa de manera que la fase apolar se sitúe en la parte superior y en la parte inferior se disponga la fase polar.

2) Purificación del ADN presente en la fase polar.

3. Procedimiento según reivindicación 2, **caracterizado** porque, en el primer paso para la extracción de ADN, la muestra de aceite o grasa de origen vegetal es emulsionada con una solución de Tris entre 20 y 500 mM preferentemente 100mM, EDTA entre 1 y 50 mM preferiblemente 10 mM y ácido ascórbico entre 0,02 % y 1 % (peso/peso) preferiblemente 0,1 %.

4. Procedimiento según reivindicación 2, **caracterizado** porque el primer paso para la extracción de ADN, consistente en la emulsión de la muestra de aceite o grasa de origen vegetal con

la solución acuosa que contiene un agente tamponante, se repite una o más veces reutilizando en cada una de las repeticiones siempre la misma fase polar.

5. Procedimiento según reivindicación 2, **caracterizado** porque el segundo paso, consistente en la purificación del ADN presente en la fase polar, se lleva a cabo en las siguientes etapas:

10 a) Eliminación de la fase apolar y posterior emulsión de la fase polar con un volumen de cloroformo u otra sustancia orgánica equivalente.

15 b) Separación de la fase apolar (que mayoritariamente es cloroformo o el disolvente utilizado) de la fase polar mediante centrifugación.

20 c) Precipitación de los ácidos nucleicos presentes en la fase polar y redisolución de los mismos en solución acuosa.

25 d) Incubación de la solución acuosa obtenida tras el paso anterior con PVP insoluble a temperatura mayor a 50°C, siendo los restos de PVP eliminados mediante centrifugación.

30 e) Disminución, mediante sucesivos tratamientos con PVP insoluble, de los componentes distintos de ácidos nucleicos y agua presentes en la muestra hasta niveles que permiten realizar ensayos de reacción en cadena de la polimerasa.

35 6. Procedimiento según reivindicación 5, **caracterizado** porque en la etapa a) la emulsión de la fase polar con cloroformo u otra sustancia orgánica equivalente, se hace con un volumen de este disolvente entre 0,2 y 5 veces el volumen de la fase polar.

45

50

55

60

65



## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) Int. Cl.7: C12N 15/10

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HELLEBRAND, M.; NAGY, M.; MÖRSEL, J.-T. Determination of DNA traces in rapeseed oil. Z Lebensm Unters Frosch A. 1998, Vol. 206, páginas 237-242.	1,2,4
Y		3
A		5,6
Y	MA, X.Q.; DUAN, J.A.; ZHU, D.Y.; DONG, T.T.X.; TSIM, K.W.K. Species identification of Radix astragali (Huangqi) by DNA sequence of its 5S-rRNA spacer domain. Phytochemistry. 2000, Vol. 54, páginas 363-368.	3
A		5,6
A	KHANUJA, S.P.S.; SHASANY, A.K.; DAROKAR, M.P.; KUMAR, S. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secundary metabolites and essential oils. Plant Molecular Biology Reporter. 1999, Vol. 17, páginas 1-7.	3-6

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

O: referido a divulgación no escrita

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

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

A: refleja el estado de la técnica

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 03.12.2003	Examinador E. Relaño Reyes	Página 1/1
--	-------------------------------	---------------