

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 578 521**

21 Número de solicitud: 201500058

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

26.01.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.07.2016

Fecha de la concesión:

07.02.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

14.02.2017

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD FRANCISCO DE
VITORIA (FUFV) (100.0%)
Carretera M-515 de Pozuelo a Majadahonda, km.
1,800
28223 Pozuelo de Alarcón (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**SANTOS TEJEDOR , Cruz y
BASELGA CARRETERO , Ignacio**

54 Título: **Método de identificación de cepas de levaduras vínicas a partir de muestras de mosto**

57 Resumen:

Método de identificación de cepas de levaduras vínicas a partir de muestras de mosto.

El método se basa en un análisis genómico mediante la técnica de AFLPs (amplified fragment length polymorphism) utilizando dos pares de oligonucleótidos específicos sobre muestras de ADN. El método permite la detección, identificación y diferenciación entre cepas de levaduras vínicas. El ADN de partida se puede obtener de cultivos puros de levadura o bien de muestras complejas como el mosto de uva.

ES 2 578 521 B1

DESCRIPCIÓN

5 Método de identificación de cepas de levaduras vínicas a partir de muestras de mosto

SECTOR DE LA TÉCNICA

10

La invención que se presenta describe un **método para detectar e identificar a nivel de cepa, las levaduras vínicas** presentes en muestras complejas de mosto. El método se basa en un análisis genómico mediante la técnica de AFLPs (amplified fragmentlengthpolymorphism) utilizando dos pares de oligonucleótidos específicos sobre muestras de ADN total purificado de
15 muestras de mosto.

ESTADO DE LA TÉCNICA

20

La industria vitivinícola española es una de las más importantes del mundo por la cantidad y la calidad de los vinos que se producen. El proceso de elaboración del vino sigue a grandes rasgos las directrices tradicionales, si bien durante las últimas décadas se ha tendido a estandarizar los métodos de
25 vinificación mediante el uso de levadura comercial que permite un buen control del proceso. Esto ha llevado a producir vinos de buena calidad pero muy similares entre sí.

En la actualidad, son cada vez más las bodegas que buscan métodos y/o variedades de uva que les permitan la producción de vinos con unas
30 características y una tipicidad que les diferencien del resto. Para conseguir este objetivo las bodegas están desarrollando nuevas técnicas agronómicas, más

respetuosas con la tierra y la vid, y también se está innovando en el proceso de vinificación, utilizando las levaduras indígenas propias de cada zona y nuevas tecnologías que permiten realizar la fermentación en las condiciones deseadas. Durante la fermentación alcohólica, además de alcohol y anhídrido carbónico, las levaduras aportan al mosto gran cantidad de metabolitos que están directamente implicados en las características organolépticas del vino. Las levaduras del género *Saccharomyces* son las responsables de la fermentación de la mayor parte de los azúcares del mosto, pero diversos estudios han demostrado que la presencia de levaduras de tipo no *Saccharomyces* en las etapas iniciales de la fermentación, aportan características sensoriales diferenciales al vino y le confieren mayor complejidad.

- ***Aislamiento e identificación de levaduras indígenas***

Para poder utilizar las levaduras indígenas, es necesario un trabajo previo de aislamiento e identificación. El aislamiento se realiza mediante procedimientos microbiológicos clásicos utilizando medios de cultivo que permiten el crecimiento de levaduras. La identificación se hace utilizando técnicas moleculares que en base a su secuencia de DNA y/o al uso de la reacción en cadena de la polimerasa, permite realizar análisis de cariotipo, análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLPs, AFLPs) de DNA cromosómico o DNA mitocondrial, análisis de regiones específicas de los genes de los RNA ribosómicos, de regiones microsátélites, elementos delta del transposón Tyy los sitios de procesamiento de intrones (ISS). Estas técnicas han sido muy útiles para la diferenciación entre especies de levaduras y algunas en concreto han permitido la diferenciación entre cepas de *S. cerevisiae*, levadura con el genoma secuenciado desde hace años.

- ***Técnica de AFLP***

La técnica de AFLP (del inglés Amplified Fragment Length Polymorphism, Vos et al., 1995) está basada en la amplificación selectiva de los fragmentos de restricción mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es una

técnica muy sensible para caracterizar el ácido desoxirribonucleico (ADN) cualquiera sea su origen y su complejidad, puede ser aplicado con ADN genómico total o con ADN complementario (perfiles de transcripción).

5 Los AFLP permiten una exploración rápida de los polimorfismos del genoma entero al generar un gran número de marcadores y cada uno de ellos da una huella identificadora de ADN sumamente informativa. Estos marcadores son altamente reproducibles, no se necesita información previa de las secuencias ni hay que generar sondas de hibridación. La base molecular de los polimorfismos de AFLP generalmente se origina en los nucleótidos, se detectan
10 cambios de un solo nucleótido cuando: (1) se afectan los propios sitios de restricción; y (2) se afectan los nucleótidos adyacentes a los sitios de restricción, lo que hará que los cebadores hibriden erróneamente en el extremo 3'impidiendo la amplificación. La mayoría de los marcadores de AFLP son de tipo mono-alélico, lo que significa que sólo se podrá registrar un alelo porque el
15 complementario no se detecta. Todos los métodos de mejoramiento genético y propagación masiva, que de una forma u otra pueden introducir variaciones en el genoma de las plantas, así como los estudios de diversidad genética, requieren de herramientas moleculares capaces de detectar cambios genómicos.

20 • **Construcción del mapa genético**

Una vez caracterizados los marcadores moleculares, la construcción del mapa genético implica las siguientes etapas: (i) detección de ligamento entre marcadores; (ii) ordenación de los marcadores ligados; y (iii) estimación de las distancias entre los mismos. En un mapa de moderada densidad, el volumen
25 de datos que debe manejarse en estos cálculos hace prohibitiva la identificación de ligamento a partir del cómputo de recombianes, por lo que existe un gran número de programas para el análisis computacional de la asociación entre marcadores y su posterior ordenación dentro de los grupos de ligamiento.

30 La mayoría de los programas que se utilizan en la construcción de mapas genéticos usan los mismos datos estadísticos básicos, llamados análisis de

dos puntos para estimar tasas de recombinación y testar ligamiento entre pares de marcadores. Sin embargo, los programas difieren en varios conceptos, como el tipo de población de muestreo que puede analizar (retrocruzamiento, F2, pedigríes clásicos, etc.); los algoritmos utilizados para estimar las frecuencias de recombinación multipunto, el método empleado para ordenar marcadores; y en algunas características informáticas (formato de datos, interface, características gráficas, etc.). A continuación se citan algunos de los programas de mapeo genético:

Nombre de la herramienta	Descripción	Referencia
LIPED	Herramienta de análisis de dos puntos. cálculo de puntuación LOD. Programa disponible para computar numéricamente verosimilitudes en pedigríes grandes.	Ott, 1986*
CRI-MAP	Desarrollado inicialmente para analizar sistemas de marcadores co-dominantes en familias pequeñas se ha extendido pedigríes más generales y a sistemas de dominancia simple.	Golgar 1989*
LINKAGE	Paquete de herramientas que incluye análisis multipunto. Cálculo de puntuación LOD	Dausset 1990*
GENEHUNTER	Herramienta que incluye análisis de ligamento paramétrico y no paramétricos en un modo unificado	Kruglyak 1999*
MAPMAKER	Herramienta de análisis multipunto. Calculo de puntuación LOD. Puede analizar datos con muchos <i>loci</i> pero en pedigríes pequeños y en cruces entre líneas controladas.	Lander 2000*

Nombre de la herramienta	Descripción	Referencia
JOINMAP	Programa utilizado en mapeos de especies vegetales principalmente. Puede trabajar con todo tipo de poblaciones. La ordenación de marcadores se obtiene calculando frecuencias de recombinación por pares y las distancias de mapas se estiman por un procedimiento de mínimos cuadrados.	Van Ooijen 2001*

* Fuente: Desarrollo de un mapa genético con marcadores AFLP. Gloria Gonzalez Fortes, Universidad Santiago de Compostela, 2013

Sin embargo no existe un programa óptimo para todas las prestaciones.

5

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención consiste en el desarrollo de un método rápido de
 10 identificación de levaduras vínicas a partir de muestras de mosto, **sin
 necesidad de aislamiento y cultivo previo** de las levaduras. El método se
 basa en el uso de la técnica de AFLP y el desarrollo de una aplicación
 informática que analiza de manera eficiente los datos obtenidos, de modo que
 permite identificar las especies de levadura presentes en la muestra y
 15 diferenciar entre cepas.

El proceso de purificación de DNA a partir de muestras de mosto es
 fundamental ya que se requiere DNA de alta pureza y libre de contaminantes
 que puedan interferir en las reacciones posteriores. Para ello, se toman
 muestras de mosto y mediante centrifugación se sedimentan todas las
 20 levaduras presentes. A continuación se realizan una serie de lavados con
 solventes orgánicos y agua estéril para finalizar con un tratamiento con
 proteinasa K. De este modo se eliminan los taninos y otros compuestos que
 pueden interferir en la purificación posterior de los ácidos nucleicos. La

purificación del ADN total de la muestra se realiza con el kit "Master PureYeast DNA Purification" de Eppicentre, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración de ADN en la muestra se determina utilizando un espectrofotómetro Nanodrop®.

5 Para el ensayo de AFLP, se parte de 50ng de ADN total purificado de la muestra de mosto. El ADN se digiere con las enzimas de restricción *EcoRI* y *MseI* y a continuación se ligan unos oligonucleótidos adaptadores específicos a los fragmentos de ADN generados tras la digestión. La mezcla de ligación se utiliza a continuación como molde en una primera reacción de PCR para
10 amplificar los fragmentos de ADN con extremos *EcoRI* - *MseI*. En esta reacción se utilizan como cebadores oligonucleótidos de secuencia complementaria a los adaptadores anteriormente ligados a los fragmentos de ADN (*MseI*-A1, *MseI*-A2, *EcoRI*-1p, *EcoRI*-2p). El ADN obtenido de esta reacción se utiliza en una segunda reacción de PCR, la amplificación selectiva en la que se
15 utilizan como cebadores oligonucleótidos de secuencia igual a los de la primera PCR pero a los que se han adicionado dos nucleótidos en su extremo 3', de manera que en esta segunda reacción solamente se van a amplificar subpoblaciones del conjunto del ADN de la mezcla. En nuestro caso, para la diferenciación entre especies y cepas de levaduras vínicas, hemos
20 seleccionado dos pares de oligonucleótidos, denominados S (*EcoRI*-AC-FAM + *MseI*-T) y J (*EcoRI*-TA-HEX + *MseI*-CT), que conjuntamente tienen un alto poder de discriminación. Con estos pares de cebadores los fragmentos de ADN que se amplifican tienen un tamaño de 50 a 250 pb y además quedan marcados con los fluoróforos FAM y HEX. Estos fragmentos así generados se
25 resuelven mediante electroforesis capilar obteniendo de este modo un electroferograma que permite discriminar entre fragmentos que difieran únicamente en dos o tres pares de bases.

Los electroferogramas que se obtienen de las muestras de mosto son complejos y su análisis se hace utilizando una aplicación informática que se ha
30 desarrollado con este fin. Para ello, previamente se ha creado una base de datos con los perfiles AFLP de más de 500 aislados diferentes de levaduras vínicas de las especies *Hanseniaspora uvarum*,

Kluyveromycesthermotherans, *Torulasporadelbrueckii*,
Metchnikowiapulcherrima, *Pichiaanomala*, *Saccharomycescerevisiae* y
Saccharomycesuvarum. El programa lo que hace es comparar los alelos del
5 electroferograma con la información presente en la base de datos que se ha
generado previamente y que incluye los perfiles de alelos específicos de
especie y/o cepa de levadura.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10

Figura 1: Descripción del Programa diseñado para el análisis de resultados AFLP y búsqueda de similitudes entre muestras problema desconocidas y los conjuntos de alelos AFLP especie-específicos o cepa-específicos.

- 15 **A.** Nombre grupo de alelos AFLP especie-específicos o cepa-específicos;
B. Tamaño de los alelos especie-específicos cepa-específicos;
C. Presencia o ausencia del alelo;
D. Nombre de la muestra problema;
E. Conjunto alelos de la muestra problema;
20 **F.** Abundancia del alelo;
G. Porcentaje similitud;
H. Tabla de control: Hoja del libro en la que se lleva a cabo la comparación de los fragmentos y se determina la similitud;
I. Perfiles: Hoja del libro en la que aparecen todos los perfiles que se van a
25 comparar hasta un total de 50;
J. Muestra: Hoja del libro en la que aparecen todas las muestras que se van a comparar hasta un total de 50;
K. Porcentajes de similitud.

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

I. Oligos

Oligos Adaptadores: 0

- 5 →Msel: Msel-A1: GACGATGAGTCCTGAG
 Msel-A2: TACTCAGGACTCAT
 →EcoRI: EcoRIL-1p: CTCGTAGACTGCGTACC
 EcoRIL-2p: AATTGGTACGCAGTCTAC

Par de Oligos Preselectivos:

- 10 → Msel0: GATGAGTCCTGAGTAA
 → EcoRIL-1p: CTCGTAGACTGCGTACC

Pares de Oligos Selectivos:

Fluoróforo	Par de Oligos	EcoRI	Msel
Marcado con HEX	M	GACTGCGTACCAATTCTA	GATGAGTCCTGAGTAACG
	N	GACTGCGTACCAATTCTA	GATGAGTCCTGAGTAACT
	J	GACTGCGTACCAATTCTA	GATGAGTCCTGAGTAACA
	Q	GACTGCGTACCAATTCTA	GATGAGTCCTGAGTAACC
Marcado con FAM	H	GACTGCGTACCAATTCAC	GATGAGTCCTGAGTAACC
	G	GACTGCGTACCAATTCAC	GATGAGTCCTGAGTAACA
	S	GACTGCGTACCAATTCAC	GATGAGTCCTGAGTAAT

II. Tratamiento del mosto para la posterior extracción de DNA genómico total:

- 5 1. Homogeneizar la muestra de mosto, coger 15-25 ml y ponerlos en un tubo de 50 ml.
2. Añadir un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) al tubo con el mosto y mezclar bien utilizando el vortex. Dejar reposar 1 minuto.
3. Recoger la fase acuosa y pasarla a otro tubo de 50 ml.
- 10 4. Centrifugar a 3500 rpm durante 8 minutos.
5. Descartar el sobrenadante y añadir 2 ml de agua destilada para lavar el precipitado.
6. Centrifugar a 3500 rpm durante 8 minutos.
7. Descartar el sobrenadante y re-suspender en 5 ml de agua destilada.
- 15 8. Repartir en volúmenes de 1 ml en tubos eppendorf de 1.5 ml.
9. Centrifugar a 13.000 rpm durante 2 minutos y descartar el sobrenadante por completo.
10. Re-suspender en 200 µL de buffer Tris-Cl 50mM, pH 7.4, EDTA 20nM, SDS 2%, 4,5 mg/ml Proteinasa K. Incubar 12 horas a 37 °C.
- 20 10. Realizar el proceso de extracción del ADN genómico utilizando un kit o cualquier protocolo.

III. Tratamiento informático de los electroferogramas de AFLPs.

GeneMapper®: En el software de ApplyBiosystem® (GeneMapper®) se cargan
25 los archivos (de extensión ".fsa") que se obtienen de cada una de las muestras a través de la electroforesis capilar. Se analizan las muestras clasificándolas primero por especies (previamente identificadas utilizando diferentes técnicas de biología molecular) y comprobando similitudes y diferencias entre los electroferogramas de cada muestra. Después se descarga el archivo del
30 GeneMapper® en el que te viene la información de cada muestra (fragmentos, abundancia y tamaño) y se chequean y comparan uno a uno. De esta forma, se

consiguen identificar los fragmentos, o picos, que se repiten y entre que muestras, pudiendo determinarse cuáles son comunes de la especie y cuáles de cepa. Todos estos datos se distribuyen en tablas y una vez se tiene toda la información de cada una de las especies se comparan los fragmentos entre diferentes especies pudiendo determinarse que fragmentos son o no únicos de especies. Determinamos así perfiles tanto únicos de especie como únicos de cepa, pudiendo determinar a qué especie y/o cepa pertenece una muestra desconocida. Para ello, lo que hacemos, es introducir, utilizando las propias herramientas del GenMapper®, esos perfiles específicos de especies y cepas y lanzar contra ellos las muestras desconocidas.

→ Excel®: Una vez determinados los perfiles únicos de especies y cepas, puede utilizarse una tabla dinámica de Excel que hemos diseñado. En ella tienes una columna fija con el perfil específico y otras columnas en las que vas introduciendo los valores de cada muestra volcados desde el GeneMapper® (altura y tamaño). La hoja lo que hace es buscar el perfil específico en las muestras introducidas, dándonos un porcentaje de similitud en base a los criterios que le introducimos nosotros.

A partir de hojas dinámicas de Excel se ha desarrollado un programa basado en macros para el análisis de los datos que se obtienen de los AFLP resueltos por electroforesis capilar.

En bloques de tres columnas se podrán incluir en la hoja "Perfiles" (Fig. 11) hasta un total de 50 grupos de alelos AFLP especie-específico o cepa-específico en función de los que se necesiten para llevar a cabo un análisis. En una de las columnas se anota el nombre de la especie y el par de oligonucleótidos con el que se generó el conjunto de alelos AFLP, en otra queda registrado el tamaño de cada uno de los alelos AFLP de cada conjunto y en una tercera columna se indicará la presencia o ausencia de cada alelo con un 1 o un 0, lo que nos permitirá calcular el porcentaje de similitud entre la muestra problema y el conjunto de alelos (Fig. 1A, 1B y 1C). Por otro lado, de forma similar, las muestras problema también se incluyen en bloques de tres

columnas en la hoja "Muestra" (Fig. 1J), siendo también el máximo de muestras a analizar 50. En este caso en una columna aparecerá el nombre de la muestra, en la siguiente columna el conjunto de alelos que componen el perfil AFLP obtenido y una tercera columna en la que aparece reflejada las abundancias de cada alelo y que nos permite determinar la validez de los mismos (Figura 1D, 1E y 1F).

El programa compara la columna de alelos AFLP especie-específicos o cepa-específicos con la columna de alelos AFLP de la muestra problema de forma automática, llevando a cabo la comparación de todos los conjuntos de alelos de la hoja "Perfiles" frente a todos los grupos de alelos de la hoja "Muestra". El resultado que devuelve el programa es un porcentaje de similitud (Fig. 1G), que se almacena en la hoja "Porcentaje de similitud" (Fig. 1K) y que muestra que porcentaje del conjunto de alelos especie-específicos o cepa-específicos son comunes a los alelos de una muestra problema (Fig. 1L). De este modo se puede determinar la presencia o ausencia de una especie o cepa concreta en la muestra problema analizada. Todo el proceso comparativo se lleva a cabo en la hoja "Tabla de control" (Fig. 1H), que es en la que el programa lleva a cabo el proceso comparativo.

REIVINDICACIONES

- 1.-Método para la detección e identificación de especies y cepas de levaduras
5 vónicas presentes en muestras de mosto de uva, antes o durante la
fermentación alcohólica, sin necesidad de cultivo microbiológico.
- 2.- Método basado en la reivindicación 1 basado en la identificación de ADN
total purificado de las muestras de mosto, que permite detectar las diferentes
10 levaduras presentes en la muestra de un modo rápido.
- 3.- Método basado en la reivindicación 1 estableciendo un procedimiento de
recogida de las levaduras totales del mosto que permite la posterior purificación
de los ácidos nucleicos con un nivel de pureza que no interfiere en las
15 posteriores reacciones dirigidas a la obtención de los AFLP.
- 4.- Procedimiento de obtención de AFLPs basado en dos pares de
oligonucleótidos específicos que permiten discriminar entre las diferentes
especies de levaduras vónicas de tipo *Saccharomyces* y no *Saccharomyces*.
20
- 5.- Procedimiento basado en la reivindicación 4 para especies de levaduras
vónicas no *Saccharomyces*.
- 6.- Procedimiento de tratamiento de datos obtenidos tras la resolución
25 mediante electroforesis capilar de los fragmentos AFLP amplificados, utilizando
una aplicación informática que detecta perfiles específicos de especie o cepa
de levadura en el conjunto de alelos AFLP que se obtienen de las muestras
complejas de mosto.

A	B	C	D	E	F	G	H	I
M	T	A	M	T	A			
Pa-S	171	1	M3.3.1 (I).fsa	116,26	159			
Pa-S	125	1	M3.3.1 (I).fsa	118,56	347	%Similitud		100%
Pa-S	125	1	M3.3.1 (I).fsa	120,98	485			
			M3.3.1 (I).fsa	122,08	981			
			M3.3.1 (I).fsa	125,06	609			
			M3.3.1 (I).fsa	128,38	885			
			M3.3.1 (I).fsa	129,6	298			
			M3.3.1 (I).fsa	170,99	1216			
			M3.3.1 (I).fsa	184,88	435			
			M3.3.1 (I).fsa	186,88	259			
			M3.3.1 (I).fsa	189,4	968			
			M3.3.1 (I).fsa	192,74	398			
			M3.3.1 (I).fsa	194,4	136			
			M3.3.1 (I).fsa	199,9	584			
			M3.3.1 (I).fsa	200,72	125			
			M3.3.1 (I).fsa	203,07	332			
Tabla Control Perfiles Muestra Porcentajes similitud								
	H	I	J	K				

Figura 1



- ②① N.º solicitud: 201500058
②② Fecha de presentación de la solicitud: 26.01.2015
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2008083456 A1 (CANAVIALIS S A et al.) 17.07.2008, resumen; reivindicaciones.	1,2
X	MUIR ALASTAIR et al. A multiplex set of species-specific primers for rapid identification of members of the genus Saccharomyces. FEMS yeast research England Nov 2011 (11.2011) VOL: 11 No: 7 Págs: 552-563 ISSN 1567-1364 (Electronic) Doi: doi:10.1111/j.1567-1364.2011.00745.x pubmed:22093682.	1-6
X	SHARPE BEN et al. Synteny analysis provides a route to design genus-specific PCR primers for rapid identification of all Saccharomyces species. FEMS yeast research England May 2014 (05.2014) VOL: 14 No: 3 Págs: 517-525 ISSN 1567-1364 (Electronic) Doi: doi:10.1111/1567-1364.12124 pubmed:24215185.	1-6
X	LOPANDIC K; et al. "Genetically different wine yeasts isolated from austrian vine-growing regions influence wine aroma differently and contain putative hybrids between Saccharomyces cerevisiae and Saccharomyces kudriavzevii" FEMS YEAST RESEARCH, 20070901 VOL - 7 NR - 6 PG - 953-965 doi:10.1111/J.1567-1364.2007.00240.X.	1-6
X	DE BARROS et al. "AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation". Int J Syst Bacteriol. 1999 Abr; 49 Pt 2:915-24. - ISSN 1567-1356.	1-6
X	AZUMI MASATOSHI et al. "AFLP analysis of type strains and laboratory and industrial strains of Saccharomyces sensu stricto and its application to phenetic clustering" Yeast 15 Septiembre, 2001 VOL - 18 NR - 12 PG - 1145-1154 - ISSN 0749-503X.	1-6
X	JAVIER GALLEGO F et al. "Comparison of RAPDs, AFLPs and SSR markers for the genetic analysis of yeast strains of Saccharomyces cerevisiae" Food microbiology, 20051201 VOL - 22 NR - 6 PG - 561-568 doi:10.1016/j.fm.2004.11.019.	1-6
X	ESTEVE-ZARZOSO B et al "A new simplified AFLP method for wine yeast strain typing" Food Science and Technology, 20101201 VOL - 43 NR - 10 PG - 1480-1484 doi:10.1016/j.lwt.2010.05.016.	1-6

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
15.06.2015

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/5

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

C12Q

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. EMBASE, BIOSIS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.06.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 6	SI
	Reivindicaciones 1-5	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-6	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	WO 2008083456 A1 (CANAVIALIS S A et al.)	17.07.2008
D02	MUIR ALASTAIR et al. A multiplex set of species-specific primers for rapid identification of members of the genus <i>Saccharomyces</i> . FEMS yeast research England Nov 2011 (11.2011) VOL: 11 No: 7 Págs: 552-563 ISSN 1567-1364 (Electronic) Doi: doi:10.1111/j.1567-1364.2011.00745.x pubmed:22093682	31.10.2011
D03	SHARPE BEN et al. Synteny analysis provides a route to design genus-specific PCR primers for rapid identification of all <i>Saccharomyces</i> species. FEMS yeast research England May 2014 (05.2014) VOL: 14 No: 3 Págs: 517-525 ISSN 1567-1364 (Electronic) Doi: doi:10.1111/1567-1364.12124 pubmed:24215185	30.04.2014
D04	LOPANDIC K; et al. "Genetically different wine yeasts isolated from austrian vine-growing regions influence wine aroma differently and contain putative hybrids between <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and <i>Saccharomyces kudriavzevii</i> " FEMS YEAST RESEARCH, 20070901 VOL - 7 NR - 6 PG - 953-965 1364.2007.00240.X	2007
D05	DE BARROS et al. "AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation". Int J Syst Bacteriol. 1999 Abr; 49 Pt 2:915-24. - ISSN 1567-1356	1999
D06	AZUMI MASATOSHI et al. "AFLP analysis of type strains and laboratory and industrial strains of <i>Saccharomyces sensu stricto</i> and its application to phenetic clustering" Yeast 15 Septiembre, 2001 VOL - 18 NR - 12 PG - 1145-1154 - ISSN 0749-503X	2001
D07	JAVIER GALLEGO F et al. "Comparison of RAPDs, AFLPs and SSR markers for the genetic analysis of yeast strains of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " Food microbiology, 20051201 VOL - 22 NR - 6 PG - 561-568 doi:10.1016/j.fm.2004.11.019	2005
D08	ESTEVE-ZARZOSO B et al. "A new simplified AFLP method for wine yeast strain typing" Food Science and Technology, 20101201 VOL - 43 NR - 10 PG - 1480-1484 - doi:10.1016/j.lwt.2010.05.016	2010

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 invención se refiere a un procedimiento de identificación de levaduras vínicas mediante AFLPs y posterior procesamiento de los datos mediante electroforesis capilar del que se obtienen un electroferograma con picos para los diferentes alelos amplificados que son tratados con un software que asocia el perfil a las cepas concretas.

D01 divulga un método para determinar el genotipo, en una muestra, del complejo *Saccharum* que comprende las etapas de: (i) obtener el ADN de la muestra;(ii) amplificar de distintos locis(iii) separación de los productos de amplificación por tamaño; y la comparación de los resultados conseguidos con los resultados de análisis de ADN de una especie conocida. Así pues el objeto de la invención que aparece en las reivindicaciones 1,2 carece de novedad tal y como se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986.

D02 y D03 se refieren a cebadores específicos para la identificación de cada especie del género *Saccharomyces*

D04 se refiere a un estudio para investigar la biodiversidad de las cepas de levadura de vinos austriacos utilizando AFLP. Emplean tres sets de cebadores.

En D05 se describe el uso de AFLP para investigar la variación genética en cepas comerciales, cepas tipo y aislados de bodegas,

En D06 se describe el uso de AFLP para caracterizar cepas tipo, industriales y de laboratorio de *Saccharomyces*. Se utilizan 9 pares de cebadores específicos.

En D07 se comparan distintos métodos para el análisis genético de *Saccharomyces cerevisiae*.

D08 utilizó la misma técnica de la invención para monitorizar cepas de *Saccharomyces cerevisiae* así como otras especies de levaduras durante la fermentación industrial del vino. En este caso en lugar de análisis por electroforesis capilar se utiliza electroforesis en gel de agarosa visualizado con luz ultravioleta después de un marcaje con bromuro de etidio en lugar de con fluoróforos o radioactividad.

A la luz de los documentos del estado de la técnica se considera que la tecnología AFLP es una técnica bien establecida y que ya se ha utilizado con anterioridad para discriminar cepas y especies de levaduras relacionadas con la producción vinícola. Así pues las reivindicaciones 3-5 carecerían de novedad tal y como se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986.

La diferencia entre el procedimiento divulgado en la reivindicación 6 sería la resolución de los fragmentos mediante electroforesis capilar y la aplicación de herramientas informáticas para el tratamiento de los perfiles específicos de cada especie. Sin embargo, esta diferencia no supone efecto técnico sorprendente alguno puesto que la electroforesis capilar es una técnica de sobra conocida como alternativa a las electroforesis en otros soportes, como geles o papel, así como la incorporación de herramientas informáticas para el tratamiento de los datos obtenidos. Tampoco se consideraría inventiva el diseño de cebadores específicos para llevar a cabo el procedimiento reivindicado; solo podría justificarse la actividad inventiva de oligonucleótidos si la elección de los cebadores utilizados supusiese una ventaja técnica, o se derivase de su uso un efecto sorprendente inesperado y que no fuese una mera alternativa o variación del estado de la técnica obvia para un experto en la materia, como parece que es el caso a la luz de los documentos D02-D03.

Así pues, el procedimiento que aparece en las reivindicaciones 1-6 carecería de actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986.