



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 273 531**

⑫ Número de solicitud: 200302493

⑬ Int. Cl.:
G01N 33/02 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G09F 3/00 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **24.10.2003**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2007**

Fecha de la concesión: **17.03.2008**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **16.04.2008**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

⑲ Titular/es: **NEWBIOTECHNIC, S.A.**
Avenida Américo Vespucio, 69
41092 Sevilla, ES

⑳ Inventor/es: **Rey Barrera, Manuel;**
Llobell González, Antonio y
Monte Vázquez, Enrique

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Polinucleótidos como biotrazadores de productos alimenticios.**

㉓ Resumen:

Polinucleótidos como biotrazadores de productos alimenticios.

La invención se refiere al empleo de polinucleótidos como biotrazadores alimentarios para trazar y verificar productos alimenticios. Se describe un método para analizar la autenticidad de un producto alimenticio marcado con un polinucleótido etiqueta añadido exógenamente que comprende recuperar el material genético extracelular presente en dicho producto alimenticio marcado y analizar dicho material genético extracelular para comprobar si contiene dicho polinucleótido etiqueta. Dicho método puede ser utilizado para autenticar productos alimenticios, garantizar su calidad y evitar o minimizar el fraude. De aplicación en la industria alimentaria.

ES 2 273 531 B1

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

DESCRIPCIÓN

Polinucleótidos como biotrazadores de productos alimenticios.

5 Campo de la invención

La invención se relaciona, en general, con el empleo de polinucleótidos como biotrazadores para trazar y verificar productos alimenticios. En particular, la invención se relaciona con un método para marcar un producto alimenticio y verificar su autenticidad posteriormente mediante la detección de un polinucleótido biotrazador exógeno previamente
10 añadido a dicho producto alimenticio durante su proceso de elaboración.

Antecedentes de la invención

La trazabilidad alimentaria se define como la capacidad de rastrear un alimento desde su origen hasta el consumi-
15 dor, dando lugar a una identificación fiable de sus ingredientes, un control sanitario, y un seguimiento del alimento durante toda la cadena de producción. La trazabilidad es, por tanto, una herramienta fundamental al servicio de la calidad alimentaria.

La producción y comercialización de materias primas para la industria alimentaria así como la producción y comer-
20 cialización de productos alimenticios de calidades inferiores a las que se especifican o que no cumplen los estándares de calidad exigidos, por ejemplo, las características propias de una denominación de origen, supone un fraude alimentario y constituye un serio problema al que tienen que hacer frente tanto las administraciones como los fabricantes y distribuidores de materias primas y productos alimenticios. Por una parte, está en juego la salud de los consumidores y el marchamo de calidad asociado con una determinada denominación de origen y, por otro lado, están las pérdidas ocasionadas a la industria alimentaria y denominaciones de origen por la comercialización fraudulenta de productos
25 (copias o imitaciones) de peor calidad.

La identificación de especies animales y vegetales, así como la detección y cuantificación de transgénicos, son las
30 dos principales áreas que han sido definidas como fundamentales para el sector alimentario en la actualidad.

La necesidad de cumplir con la normativa y combatir el fraude, así como la creciente demanda por parte del
consumidor hacia alimentos que les inspiren confianza, apuntan hacia un interés cada vez mayor por tecnologías que permitan la trazabilidad alimentaria.

El análisis de ADN se ha mostrado como una herramienta muy eficaz para determinar la trazabilidad alimentaria,
35 aunque con ciertas limitaciones. Hasta el momento, los análisis de ADN habitualmente utilizados en alimentación se basan en la caracterización de marcadores moleculares nucleares (principalmente microsátélites) o bien en el análisis de regiones conservadas del ADN mitocondrial en el material de partida y su posterior búsqueda en el producto procesado. Este método de análisis es muy útil en la identificación de materias primas y en la detección de fraudes
40 de composición pero presenta muchos inconvenientes en la trazabilidad. El fundamental es el alto coste que supone tipar genéticamente el material de partida y el alimento procesado y el número de escapes que puede tener el sistema si no se analiza un elevado número de muestras. Por otro lado, el análisis de ADN endógeno no es muy útil para la identificación de denominaciones de origen ya que en estos casos, más que la materia prima, lo característico suele ser el proceso de elaboración.

Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar un método alternativo, fiable y económico, que permita determinar la
45 trazabilidad alimentaria y que sea más eficaz en la detección de fraude.

Compendio de la invención

La invención se relaciona, en general, con el empleo de polinucleótidos como biotrazadores exógenos que se pue-
50 den añadir en cualquier estadio de la elaboración de productos alimenticios, permitiendo de ese modo la trazabilidad alimentaria de dichos productos alimenticios en todo momento. Dicho polinucleótido, en adelante denominado "po-
linucleótido etiqueta", puede ser personalizado y asociarse con una característica determinada, por ejemplo, calidad,
55 denominación de origen, certificación de calidad, productor, ingredientes, controles sanitarios, seguimiento de la ca-
dena productiva, fecha de producción, fecha de caducidad, etc., de manera que la detección de dicho polinucleótido
etiqueta en un producto alimenticio determinado, que ha sido previamente marcado en algún estadio de su proceso
de elaboración, es indicativa de la autenticidad y características de dicho producto alimenticio. La autenticidad de un
producto alimenticio puede ser comprobada mediante la detección de la existencia de dicho polinucleótido etiqueta.

Una característica que debe cumplir el polinucleótido etiqueta a añadir al producto alimenticio radica en que se trata
de un polinucleótido exógeno, es decir, un polinucleótido que se añade al producto alimenticio, y que aunque posee
la misma naturaleza química que el endógeno, no forma parte del material biológico (células, ácidos nucleicos, etc.)
que eventualmente pudieran estar presentes en el producto alimenticio a trazar y, por tanto, no se encuentra de forma
65 natural en el producto alimenticio a trazar. Por tanto, dicho polinucleótido etiqueta debe tener unas características
de tamaño (longitud) y composición (secuencia) que garanticen su estabilidad frente a la degradación y permitan
su detección posterior de forma precisa y fiable, por cualquier técnica apropiada, independientemente de la posible
existencia de otros ácidos nucleicos en el producto alimenticio propios de dicho producto alimenticio.

Un método como el desarrollado por esta invención permite marcar un producto alimenticio y posteriormente verificar su autenticidad de forma sencilla, fiable y económica, mediante la detección de un polinucleótido etiqueta (biotrazador) previamente añadido a dicho producto alimenticio durante su proceso de elaboración. Asimismo, dicho método sirve no solo para detectar, evitar o minimizar el fraude alimentario sino, además, podría ser adaptado para su empleo en procesos de certificación de alimentos.

Por tanto, un aspecto de esta invención se relaciona con un método para analizar la autenticidad de un producto alimenticio marcado con un polinucleótido etiqueta.

Otro aspecto de esta invención se relaciona con un método para marcar un producto alimenticio con un polinucleótido etiqueta con el fin de poder verificar posteriormente, si se desea, su autenticidad. El producto alimenticio marcado con dicho polinucleótido etiqueta constituye un aspecto adicional de esta invención.

Otro aspecto adicional de esta invención se relaciona con un método para marcar un producto alimenticio y verificar su autenticidad posteriormente mediante la detección de un polinucleótido biotrazador previamente añadido a dicho producto alimenticio durante su proceso de elaboración.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una fotografía del gel de agarosa en la que se muestran la detección mediante PCR y posterior tinción con bromuro de etidio de las bandas de amplificación de los polinucleótidos etiqueta añadidos al vino (calle 1) y al lomo (calle 2) [véase el Ejemplo 1]. La calle 3 se corresponde con el control negativo de amplificación [agua] y la calle 4 con el marcador de peso molecular de 1 kilobase (Roche).

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un método para analizar la autenticidad de un producto alimenticio marcado con un polinucleótido etiqueta que comprende recuperar el material genético extracelular presente en dicho producto alimenticio marcado y analizar dicho material genético extracelular recuperado para comprobar si contiene dicho polinucleótido etiqueta.

El producto alimenticio susceptible de ser analizado según el método de la invención puede ser prácticamente cualquier producto alimenticio, que contenga o no material biológico (por ejemplo, ácidos nucleicos). El término “producto alimenticio” tal como aquí se utiliza incluye tanto materias primas para la industria alimentaria, por ejemplo, cereales, legumbres, hortalizas, frutas, etc., como productos alimenticios manipulados o no manipulados, por ejemplo, productos rebozados, precocinados, congelados, etc. Dicho producto alimenticio puede ser un producto sólido, por ejemplo, carnes, pescados, aves, pastas, etc.; líquido, por ejemplo, leche, derivados lácteos bebibles, bebidas tanto alcohólicas (vinos, cervezas, etc.) como no alcohólicas (zumos, refrescos, etc.); o semisólido, por ejemplo yogures, potitos, purés, etc.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “polinucleótido etiqueta” se refiere a un polinucleótido que permite determinar la trazabilidad alimentaria de un producto alimenticio, por lo que resulta útil para identificar el origen del producto alimenticio, su composición, denominación de origen, certificación de calidad, controles sanitarios a los que ha sido sometido y seguimiento de su cadena productiva, etc., factores que influyen en la calidad del producto alimenticio. El empleo de dicho polinucleótido etiqueta contribuye a garantizar la calidad de un producto alimenticio y, además, a evitar o minimizar el riesgo de fraude para el consumidor. Por tanto, los fabricantes de productos alimenticios podrán seleccionar sus polinucleótidos etiqueta de forma personalizada, es decir, de manera que puedan identificar sus productos alimenticios de los elaborados por otros fabricantes. Para ello bastaría con seleccionar unos polinucleótidos etiqueta y asociarlos con el origen empresarial de tales productos alimenticios. Asimismo, se podrán seleccionar polinucleótidos etiqueta indicativos de la denominación de origen de un producto alimenticio, o garantizantes de un determinado estándar de calidad, o indicativos de las distintas calidades de los productos alimenticios que produzcan, o bien se podrán seleccionar polinucleótidos etiqueta para identificar distintos lotes de producción y facilitar la identificación de las fechas de caducidad de tales lotes; incluso se podrán seleccionar polinucleótidos etiqueta específicos a incorporar en normas de certificación de calidad de productos alimenticios.

El polinucleótido etiqueta puede estar constituido por una secuencia de ADN o bien por una secuencia de ARN, preferentemente por una secuencia de ADN, con una composición y tamaño que permita su detección posterior, de forma fiable y reproducible, mediante técnicas apropiadas.

Dicho polinucleótido etiqueta puede proceder de un organismo, por ejemplo, un animal, una planta, una bacteria, una levadura, un hongo, un virus, etc., o bien puede ser de origen sintético. En una realización particular, dicho polinucleótido etiqueta procede del ADN no codificante de un organismo utilizado en alimentación, por ejemplo, levaduras, maíz, etc.

El tamaño del polinucleótido etiqueta no es un factor limitante para la puesta en práctica del método proporcionado por esta invención, por lo que puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en general, se utilizan polinucleótidos etiqueta con un tamaño apropiado para evitar o minimizar su posible degradación. En una realiza-

ción particular, dicho polinucleótido etiqueta comprende entre 50 y 600 nucleótidos, preferentemente entre 80 y 150 nucleótidos.

El polinucleótido etiqueta puede ser obtenido por cualquier método convencional, por ejemplo, mediante síntesis química utilizando sintetizadores automáticos, o bien mediante técnicas basadas en reacciones enzimáticas, por ejemplo, PCR, eligiendo como molde una secuencia de un organismo, tal como un organismo utilizado en alimentación, por ejemplo, levaduras, maíz, etc. Asimismo, el polinucleótido etiqueta puede ser detectado e identificado por cualquier técnica apropiada que permita la detección e identificación de un fragmento de ácido nucleico, opcionalmente unido a un marcador, tal como se mencionará más adelante.

Debido a que el producto alimenticio que comprende el polinucleótido etiqueta puede contener o no un material biológico, por ejemplo, ADN o ARN, la composición (secuencia) del polinucleótido etiqueta debe elegirse de forma que se evite o minimice el riesgo de proporcionar resultados incorrectos o inexactos, es decir, que no se correspondan con la realidad. Por tanto, el polinucleótido etiqueta a añadir al producto alimenticio debe ser un polinucleótido exógeno, es decir, un polinucleótido que no forma parte del material biológico (células, ácidos nucleicos, etc.) que eventualmente pudieran estar presentes en el producto alimenticio a trazar y, por tanto, no se encuentra de forma natural en el producto alimenticio a trazar. Asimismo, la secuencia del polinucleótido etiqueta debe ser elegida de tal manera que no se creen estructuras que dificulten o disminuyan el rendimiento o la fiabilidad de la técnica analítica utilizada para comprobar la existencia del polinucleótido etiqueta en el producto alimenticio ensayado. En una realización particular, la generación y posterior detección del polinucleótido etiqueta se realiza mediante una reacción de amplificación enzimática, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por lo que el principal criterio a la hora de seleccionar la secuencia del polinucleótido etiqueta consiste en obtener unos extremos a partir de los cuales se puedan diseñar unos oligonucleótidos iniciadores que cumplan todos los criterios de eficacia, tales como ausencia de estructuras secundarias, Tm similares, que no presenten tramos de un solo nucleótido repetidos más de tres veces, etc. [PCR protocols, A guide methods and applications, Ed. Innis, Gelfand, Sninsky and White] de manera que permitan amplificar específicamente el polinucleótido etiqueta en cuestión.

El polinucleótido etiqueta puede contener, además, si se desea, alguna modificación, en cualquiera de sus nucleótidos, que permita o facilite su detección y/o unión a las moléculas del producto alimenticio o bien su posterior recuperación y/o concentración para los fines de comprobación y/o detección. Dicha modificación puede ser, por ejemplo, un marcador, tal como un miembro de un par de unión específica, un fluoróforo, etc. Ejemplos ilustrativos de pares de unión específica incluyen los pares formados por, por ejemplo, avidina (o estreptavidina)/biotina, avidina/ficoeritrina, etc., así como los sistemas basados en interacciones de tipo antígeno/anticuerpo, o fragmentos de los mismos que contienen los sitios de reconocimiento. En una realización particular, el polinucleótido etiqueta está unido a biotina.

El empleo de un fluoróforo permite detectar el polinucleótido etiqueta por métodos fluorimétricos. Por tanto, en una realización particular, el polinucleótido etiqueta comprende un polinucleótido modificado que contiene un compuesto fluorescente, tal como digoxigenina, calcofluor, fluoresceína, rhodamina, etc.

La introducción del marcador en el polinucleótido puede realizarse directamente, por ejemplo, mediante reacción con formación de un enlace químico entre el polinucleótido y el marcador, o mediante simple acoplamiento, o bien a través de ligandos intermedios.

La puesta en práctica del método para analizar la autenticidad de un producto alimenticio previamente marcado con un polinucleótido etiqueta comprende la recuperación del material genético extracelular presente en dicho producto alimenticio marcado y su análisis para comprobar si contiene dicho polinucleótido etiqueta. El material genético extracelular a recuperar incluirá cualquier ácido nucleico que se encuentre presente en el producto alimenticio marcado pero fuera de las estructuras celulares eventualmente presentes en dicho producto alimenticio marcado, entre los que se encontrará el polinucleótido etiqueta añadido exógenamente.

La recuperación del material genético extracelular presente en el producto alimenticio marcado puede realizarse por cualquier método convencional. En una realización particular, la fracción de ácido nucleico extracelular puede recuperarse utilizando técnicas convencionales de purificación por afinidad. Esta forma de recoger el polinucleótido etiqueta es particularmente interesante porque dicho polinucleótido etiqueta ha sido añadido externamente y, por tanto, no habría necesidad de romper ninguna estructura celular. Alternativamente, la fracción de ácido nucleico puede ser recuperada mediante extracción/solubilización con un disolvente apropiado y posterior purificación/concentración por precipitación selectiva, filtración o por afinidad.

El análisis del material genético extracelular recuperado para comprobar si contiene dicho polinucleótido etiqueta se puede realizar por cualquier método convencional que permita detectar y/o identificar una secuencia de ácido nucleico. A modo ilustrativo, no limitativo, dicho análisis puede realizarse mediante el empleo de una sonda de nucleótidos marcada con un grupo marcador detectable, o bien mediante una reacción enzimática específica, por ejemplo, de amplificación o de restricción, o bien mediante un método basado en la detección o identificación del marcador opcionalmente presente en el polinucleótido etiqueta, o bien mediante espectroscopia de infrarrojos, etc. En una realización particular, la presencia de dicho polinucleótido etiqueta se analiza mediante el empleo de una sonda de oligonucleótidos marcada con un grupo marcador detectable. En otra realización particular, se analiza la presencia de polinucleótido etiqueta mediante una reacción enzimática específica, tal como, por ejemplo, PCR, tanto la PCR clásica como cualquiera de sus variantes, por ejemplo, nested-PCR, PCR ELISA, PCR a tiempo real, etc.

La detección del polinucleótido etiqueta se puede llevar a cabo mediante cualquier método convencional, por ejemplo, mediante el empleo de una sonda de nucleótidos capaz de hibridar con el polinucleótido etiqueta, comprendiendo dicha sonda un marcador detectable, y detectar dicho marcador por métodos convencionales, por ejemplo, mediante visualización directa en un gel. Alternativamente, la detección de dicho polinucleótido etiqueta se puede realizar mediante electroforesis en gel y tinción, o mediante electroforesis capilar y detección de un fluoróforo, o bien empleando micro o nanodispositivos que detecten señales eléctricas (cambios de potencial, etc.), o bien mediante la detección o identificación del marcador opcionalmente presente en el polinucleótido etiqueta.

De acuerdo con lo establecido por el método previamente descrito, si el producto alimenticio analizado contiene el polinucleótido etiqueta, porque ha sido adicionado previamente en un estadio de su proceso productivo, dicho polinucleótido etiqueta será detectado y/o identificado. Sin embargo, si el producto analizado no contiene dicho polinucleótido etiqueta, no se podrá detectar, por lo que se podrán distinguir unos productos alimenticios producidos por un productor determinado de otros productos alimenticios producidos por otros productores o de productos alimenticios fraudulentos.

Un método para analizar la autenticidad de un producto alimenticio marcado con un polinucleótido etiqueta como el proporcionado por esta invención permite autenticar un determinado producto alimenticio y garantizar al consumidor su calidad, origen empresarial, denominación de origen, composición, controles sanitarios, seguimiento del proceso productivo, etc., y contribuye a evitar o minimizar el riesgo de fraude, imitación o competencia desleal. Adicionalmente, dicho método podría ser utilizado en procesos de certificación de calidad de productos alimenticios.

El empleo de un polinucleótido etiqueta como aditivo alimentario, en particular, como marcador molecular para determinar la trazabilidad alimentaria de un producto alimenticio, presenta numerosas ventajas, entre las que se encuentran las siguientes:

- el ADN es una molécula de gran estabilidad mecánica, química y térmica, por lo que puede utilizarse para biotrazar prácticamente todo producto alimenticio, tanto procesado como no procesado;
- su registro como aditivo alimentario (como señalizador/trazador) no debería generar problemas ya que es una sustancia que se ingiere habitualmente en la dieta y que añadido exógenamente se comporta como un ácido orgánico que no altera las propiedades organolépticas de los alimentos;
- como fuentes de polinucleótidos etiqueta se pueden moléculas provenientes de organismos utilizados en alimentación;
- la enorme diversidad asociada al ADN permite una creación ilimitada de etiquetas, por lo que éstas se podrían personalizar (productores, productos, fechas de caducidad, estándares de calidad, etc.); y
- el análisis de verificación/autenticación se puede realizar mediante técnicas específicas que garantizan una alta sensibilidad del proceso de detección, lo que permite añadir el polinucleótido etiqueta en cantidades traza.

La puesta en práctica del método para analizar la autenticidad de un producto alimenticio desarrollado por esta invención requiere que, previamente, se haya marcado dicho producto alimenticio con un polinucleótido etiqueta.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para marcar (trazar) un producto alimenticio con un polinucleótido etiqueta con el fin de poder verificar posteriormente, si se desea, su autenticidad, que comprende añadir un polinucleótido etiqueta a dicho producto alimenticio, en el que cuando el producto alimenticio comprende un material biológico (por ejemplo, un ácido nucleico), dicho polinucleótido etiqueta es un polinucleótido exógeno, es decir, no se encuentra de forma natural en el producto alimenticio a marcar.

Las características del polinucleótido etiqueta corresponden a las definidas previamente en relación con el método para analizar la autenticidad de un producto alimenticio desarrollado por esta invención.

La adición del polinucleótido etiqueta al producto alimenticio se realiza por métodos convencionales dependiendo del tipo de producto alimenticio a trazar. Para ello, en general, se prepara una disolución del polinucleótido etiqueta en un disolvente adecuado, en el que el polinucleótido etiqueta es soluble, y dicha solución se pone en contacto con el producto alimenticio por cualquier método apropiado, por ejemplo, por simple mezcla y homogenización tras la adición de dicha solución al producto alimenticio en cualquiera de los estadios del proceso productivo, preferentemente, en los primeros estadios, o por pulverización sobre los productos alimenticios, o por inmersión de los productos alimenticios en dicha solución que contiene el polinucleótido etiqueta, etc. En otra realización particular, el polinucleótido etiqueta se añade en forma de polvo, opcionalmente mezclado con un excipiente.

El polinucleótido etiqueta se añade al producto alimenticio en una concentración tal que permita su posterior detección por la técnica elegida, por lo que es necesario conocer el nivel de sensibilidad o detección teórica de la técnica de detección elegida para hacer los ajustes correspondientes de forma que la concentración final de polinucleótido etiqueta en el producto alimenticio sea superior al límite de detección teórica de la técnica utilizada en la detección.

El producto alimenticio marcado con un polinucleótido etiqueta, en el que dicho polinucleótido etiqueta es un polinucleótido exógeno que permite verificar la calidad, productor, denominación de origen, composición, controles sanitarios, o el seguimiento de la cadena productiva de dicho producto alimenticio, etc., constituye un aspecto adicional de esta invención. Dicho producto alimenticio marcado con un polinucleótido etiqueta puede ser obtenido mediante un procedimiento como el descrito previamente mencionado.

En otro aspecto la invención se relaciona con un método para marcar un producto alimenticio y verificar su autenticidad posteriormente mediante la detección de un polinucleótido etiqueta previamente añadido a dicho producto alimenticio durante su proceso de elaboración. Tanto el marcaje del producto alimenticio como la verificación de su autenticidad se realizan de la forma previamente mencionada en esta descripción.

El siguiente ejemplo 1 lustra la invención y no puede ser considerado limitativo del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Identificación de un polinucleótido etiqueta en productos alimenticios

Se realizó este ensayo para comprobar la fiabilidad del método para analizar la autenticidad de un producto alimenticio marcado con un polinucleótido etiqueta proporcionado por esta invención. Los productos alimenticios escogidos fueron vino, como ejemplo de producto alimenticio líquido, y lomo de cerdo adobado, como ejemplo de producto alimenticio sólido. Para ello, en primer lugar, se procedió a la selección y producción de los polinucleótidos etiqueta, a continuación, se procedió a adicionar dichos polinucleótidos etiqueta a dichos productos alimenticios, y, finalmente, tras almacenar debidamente los productos alimenticios marcados durante un periodo de tiempo determinado se procedió a analizar dichos productos alimenticios marcados con el fin de comprobar la existencia de dichos polinucleótidos etiqueta.

1.1 Selección y producción de los polinucleótidos etiqueta

Para la realización de este ensayo se eligió como polinucleótido etiqueta una secuencia genómica de 133 nucleótidos de un intrón del hongo filamentoso *Trichoderma harzianum* (SEQ ID NO: 1). Los iniciadores generados para la producción de dicho polinucleótido etiqueta y su posterior detección son los identificados como INTF (SEQ ID NO: 2) e INTR (SEQ ID NO: 3). Se eligió dicho polinucleótido etiqueta, a la vista de los productos alimenticios a ensayar, y teniendo en cuenta que debido a su composición de nucleótidos no era de esperar que se crearan estructuras que afectasen adversamente al rendimiento de la PCR (método de detección elegido). Dado que la generación y posterior detección de las etiquetas se realiza mediante PCR, el principal criterio a la hora de seleccionar la secuencia fue el de obtener unos extremos a partir de los cuales se pudieran diseñar oligonucleótidos iniciadores que cumplieran todos los criterios de eficacia (ausencia de estructuras secundaria, Tm similares, que no presenten tramos de un solo nucleótido repetidos más de tres veces, etc.).

Para la producción del polinucleótido etiqueta en las cantidades que se precisa se realiza una primera PCR con los iniciadores INTF-INTR (SEQ ID NO: 2-SEQ ID NO: 3) utilizando como molde ADN genómico de *T. harzianum*. Se obtiene una banda de 133 nucleótidos que se subclona en el vector comercial pGEM-T (Promega). Una vez validada la donación mediante secuenciación, se utiliza esta construcción (pGEM-INT) como molde para la producción del polinucleótido etiqueta. Para ello se emplea un termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems). La reacción se realiza en placas de 96 pocillos y en un volumen final de 100 µl en el que se añade: iniciadores (INTF-INTR) (SEQ ID NO: 2-SEQ ID NO: 3) a una concentración final de 10 mM; dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) a una concentración final de 200 mM, ADN plasmídico (10 ng) y 2 U de Taq (Biotools), utilizando el siguiente programa:

desnaturalización inicial: precalentamiento a 94°C, durante 2 minutos;

35 ciclos de

desnaturalización a 95°C, durante 10 segundos;

anillamiento a 55°C, durante 15 segundos; y

elongación a 72°C, durante 15 segundos; y

elongación final a 72°C, durante 7 minutos.

Tras la amplificación, los productos resultantes se purifican con el sistema NucleoFast (Macherey-Nagel) y se cuantifican mediante gel. El rendimiento por pocillo osciló entre 4-10 totales. Posteriormente se hizo un pool con todos los pocillos y se cuantificó mediante espectrofotometría a 260/280 nm, obteniéndose 10 ml de una solución de polinucleótido etiqueta a una concentración de 150 ng/µl.

1.2 Adición del polinucleótido etiqueta al producto alimenticio

La solución de polinucleótido etiqueta se añade en función del tipo de producto alimenticio a trazar.

Para el vino (producto alimenticio líquido) el polinucleótido etiqueta se añade directamente a la botella, a una concentración final de 1 pg/ml (6 órdenes de magnitud por encima del límite de detección teórica de la PCR para una molécula de 133 nucleótidos). Para el lomo de cerdo adobado (producto alimenticio sólido) el polinucleótido etiqueta se añade en alguno de los pasos de elaboración del mismo a una concentración de 1 ng/ml (9 órdenes de magnitud por encima del nivel de detección teórico de la PCR para una molécula de dicho tamaño). En este caso concreto, el polinucleótido etiqueta se añade a la solución de salmuera inicial en la que se mantiene la pieza durante dos días, según el protocolo de elaboración seguido por la empresa Embutidos Artesanos Domenecha (Relleu, Alicante).

1.3 Detección de la molécula

Una vez añadido el polinucleótido etiqueta a los productos alimenticios, ambos productos se conservaron en las condiciones habituales de almacenamiento (temperatura ambiente en el caso del vino, y refrigerada en el caso del lomo adobado) durante 1 mes y posteriormente se tomaron muestras para la recolección del ADN añadido externamente y su posterior detección mediante amplificación enzimática (PCR).

En el caso del vino se partió de una muestra de 10 ml. Dado que la molécula se añadió externamente y que no había necesidad de romper ninguna estructura celular, la recolección del ADN (polinucleótido etiqueta) se realizó mediante una purificación por afinidad a una matriz (tierra de diatomeas) evitando los pasos iniciales de rotura.

Para el caso del lomo adobado el proceso fue similar con la excepción de que la toma de muestras se realizó frotando un hisopo humedecido en agua sobre la superficie del lomo puesto que el polinucleótido etiqueta no iba embutido. Para ello, se maceró el hisopo en una solución con agua y detergente durante 2 horas a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido se sometió al mismo proceso de purificación empleado en el vino.

Una vez recuperado el ADN se realizó una PCR clásica en las mismas condiciones descritas anteriormente con la diferencia de que en esta ocasión se aplican 50 ciclos de amplificación. El análisis de la PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio. Como se muestra en la Figura 1, en ambos casos se obtuvo una banda del tamaño esperado (133 nucleótidos), siendo mayor la señal procedente del vino que la del lomo.

Por tanto, este ensayo pone de manifiesto que el método para analizar la autenticidad de un producto alimenticio marcado con un polinucleótido etiqueta proporcionado por esta invención funciona correctamente.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para analizar la autenticidad de un producto alimenticio marcado **caracterizado** porque dicho producto alimenticio está marcado con un polinucleótido etiqueta añadido exógenamente y porque dicho método comprende recuperar el material genético extracelular presente en dicho producto alimenticio marcado y analizar dicho material genético extracelular para comprobar si contiene dicho polinucleótido etiqueta.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho polinucleótido etiqueta se selecciona entre un polinucleótido de ADN y un polinucleótido de ARN.
3. Método según la reivindicación 1, en el que dicho polinucleótido etiqueta comprende entre 50 y 600 nucleótidos.
- 15 4. Método según la reivindicación 1, en el que dicho polinucleótido etiqueta es un polinucleótido que procede de un animal, una planta, una bacteria, una levadura, un hongo, o un virus, o es un polinucleótido de origen sintético.
5. Método según la reivindicación 4, en el que dicho polinucleótido etiqueta procede del ADN no codificante de un organismo utilizado en alimentación.
- 20 6. Método según la reivindicación 1, en el que dicho producto alimenticio comprende material biológico y dicho polinucleótido etiqueta es un polinucleótido exógeno que no está presente de forma natural en dicho producto alimenticio.
7. Método según la reivindicación 1, en el que dicho polinucleótido etiqueta comprende, además, un marcador.
- 25 8. Método según la reivindicación 7, en el que dicho marcador es un miembro de un par de unión específica o un fluoróforo.
9. Método según la reivindicación 1, en el que la recuperación del ácido nucleico presente en el producto alimenticio marcado se realiza mediante purificación/concentración por precipitación selectiva, filtración o afinidad, opcionalmente previa solubilización con un disolvente.
- 30 10. Método según la reivindicación 1, en el que el análisis del ácido nucleico recuperado para comprobar si contiene dicho polinucleótido etiqueta se realiza mediante el empleo de una sonda de nucleótidos marcada con un grupo marcador detectable, o bien mediante una reacción enzimática específica, o bien mediante un método basado en la detección o identificación del marcador opcionalmente presente en el polinucleótido etiqueta, o bien mediante espectroscopia de infrarrojos.
- 35 11. Un procedimiento para marcar un producto alimenticio con un polinucleótido etiqueta con el fin de poder verificar posteriormente, si se desea, su autenticidad, que comprende añadir un polinucleótido etiqueta a dicho producto alimenticio, en el que cuando el producto alimenticio comprende un ácido nucleico, dicho polinucleótido etiqueta es un polinucleótido exógeno que no se encuentra de forma natural en el producto alimenticio a marcar.
- 40 12. Un producto alimenticio marcado con un polinucleótido etiqueta, en el que dicho polinucleótido etiqueta es un polinucleótido exógeno que permite verificar la calidad, productor, denominación de origen, composición, controles sanitarios, o el seguimiento de la cadena productiva de dicho producto alimenticio.
- 45 13. Empleo de un polinucleótido como biotrazador alimentario de productos alimenticios.

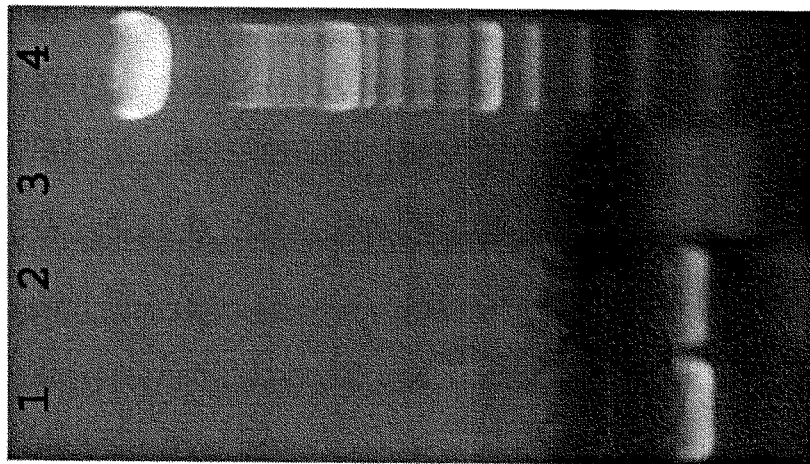
50

55

60

65

ES 2 273 531 B1



133 pb ↑

ES 2 273 531 B1

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Newbiotechnic, S.A.	
5	<120> Polinucleótidos como biotrazadores de productos alimenticios	
	<160> 3	
10	<210> 1	
	<211> 133	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Trichoderma harzianum</i>	
	<400> 1	
20	cccagaagcc taccgcgacag attcgattcc tagtgtgagt actcagactt gcagtatatg ttatatagtg tgctaatacgt gttatgcaca gtaacgatgc cgttgttccc atctcagact cttatcatgg atg	60 120 133
	<210> 2	
25	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<223> Oligonucleótico iniciador INTF	
	<400> 2	
35	cagaagccta ccgcacagat t	21
	<210> 3	
	<211> 21	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<223> Oligonucleótico iniciador INTF	
45	<400> 3	
50	catccatgat aagagtctga g	21
55		
60		
65		



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 273 531

⑫ Nº de solicitud: 200302493

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **24.10.2003**

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FR 2775693 A1 (GENOLIFE) 10.09.1999, resumen, reivindicaciones.	1-13
X	WO 02090581 A2 (GENEVISION INC) 14.11.2002, reivindicaciones 15-24.	1-13
X	WO 03052101 A1 (ROSETTA INPHARMATICS INC) 26.06.2003, reivindicaciones 1-13.	1-13
X	WO 02079490 A2 (NANOSPHERE INC) 10.10.2002, reivindicaciones 1,4.	1-13
A	GB 2387437 A (GERSAN ETS) 15.10.2003	1-13
A	WO 02079481 A1 (ICON GENETICS AG) 10.10.2002	1-13
A	WO 0049179 A1 (PROMEGA CORP) 24.08.2000	1-13

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

14.03.2007

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 33/02 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G09F 3/00 (2006.01)