

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
10 de Enero de 2008 (10.01.2008)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2008/003810 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C12N 1/20 (2006.01) C12R 1/23 (2006.01)
C12R 1/46 (2006.01) C12R 1/245 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2007/070123

(22) Fecha de presentación internacional:

29 de Junio de 2007 (29.06.2007)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

p200601789 3 de Julio de 2006 (03.07.2006) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/ Serrano 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):

TABASCO RENTERO, Raquel [ES/ES]; Instituto Del Frío, C/José Antonio Novais, E-28040 Madrid (ES). **PAARUP, Torsten** [DK/ES]; Instituto Del Frío, C/José Antonio Novais, E-28040 Madrid (ES). **JANER OTERO, Carolina** [ES/ES]; Instituto Del Frío, C/José Antonio Novais, E-28040 Madrid (ES). **PELÁEZ MARTÍNEZ, Carmen** [ES/ES]; Instituto Del Frío, C/José Antonio

Novais, E-28040 Madrid (ES). **REQUENA ROLANÍA, Teresa** [ES/ES]; Instituto Del Frío, C/José Antonio Novais, E-28040 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,

para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,

para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: METHOD FOR THE DIFFERENTIATION AND QUANTIFICATION OF LACTIC BACTERIA AND BIFIDOBACTERIA IN FERMENTED MILKS, USING SELECTIVE ANTIBIOTIC-FREE CULTURE MEDIA

(54) Título: PROCEDIMIENTO PARA DIFERENCIAR Y CUANTIFICAR BACTERIAS LÁCTICAS Y BIFIDOBACTERIAS EN LECHE FERMENTADAS QUE EMPLEA MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS LIBRES DE ANTIBIÓTICOS

(57) Abstract: The invention relates to a method for the differentiation and quantification of lactic bacteria and bifidobacteria in fermented milks, using selective antibiotic-free culture media. The method can be used for the differential and selective quantification of four species of lactic bacteria (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. acidophilus*) and *B. lactis* in mixed cultures present in fermented milks. The invention is novel and competitively advantageous in that it can reliably and simultaneously distinguish and quantify three different species of lactobacilli in relation to one another and other lactic bacteria, such as *S. thermophilus*, and bifidobacteria present in mixtures in commercial fermented milks. The specificity of the media and the different incubation conditions enable the colonies to be differentiated without the addition of antibiotics that can affect growth and, consequently, quantification. The method has been validated on the basis of specificity, reproducibility, recovery of the tested population and interspecies competition.

(57) Resumen: Procedimiento para diferenciar y cuantificar bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas que emplea medios de cultivo selectivos libres de antibióticos 5 Procedimiento que permite la cuantificación selectiva y diferencial de cuatro especies de bacterias lácticas (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. acidophilus*) y de *B. lactis* en cultivos mixtos presentes en leches fermentadas. La novedad y ventaja competitiva radica en su capacidad de distinguir y cuantificar simultáneamente de forma fiable tres especies diferentes de 10 lactobacilos entre sí y frente a otra bacteria láctica como *S. thermophilus* y a bifidobacterias presentes en mezclas en leches fermentadas comerciales La especificidad de los medios y las diferentes condiciones de incubación permiten la diferenciación de las colonias sin la adición de antibióticos que puedan afectar al crecimiento y por tanto a la cuantificación. El procedimiento ha sido 15 validado en base a especificidad, reproducibilidad, recuperación de la población ensayada y en competencia entre especies.

WO 2008/003810 A1



Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

TÍTULO:

PROCEDIMIENTO PARA DIFERENCIAR Y CUANTIFICAR BACTERIAS LÁCTICAS Y BIFIDOBACTERIAS EN LECHE FERMENTADAS QUE EMPLEA MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS LIBRES DE ANTIBIÓTICOS

5

SECTOR DE LA TÉCNICA:

La técnica se encuadra dentro del Área Agroalimentaria, en el Sector Lácteo, y desarrolla un procedimiento para el análisis de poblaciones mixtas de bacterias lácticas y bifidobacterias en yogures y leches fermentadas.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA:

El análisis de los microorganismos que se emplean en la elaboración de yogures y leches fermentadas hace referencia tanto a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, que son las únicas especies aceptadas para la elaboración del yogur [Norma de Calidad para el yogur o yoghurt, RD 179/2003 de 14 de febrero; BOE de 18 de febrero de 2003, pp. 6448-6450], como a diferentes probióticos que se han incorporado en la fabricación de nuevas leches fermentadas y que incluyen fundamentalmente a bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. En ambos casos, yogur y leches fermentadas, existen requisitos que hacen necesario el análisis de la viabilidad de los microorganismos en el producto. Dentro de la citada Norma de Calidad para el yogur se exige que *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* se encuentren viables en el producto terminado y presentes en cantidad mínima de 1×10^7 unidades formadoras de colonias (ufc) por g o mL. En el caso de las leches fermentadas que contienen microorganismos probióticos, existe un criterio generalmente aceptado que establece que para que estas bacterias ejerzan un efecto beneficioso en la salud del consumidor también deben estar viables y en elevadas poblaciones, estimándose una población recomendada en el producto en el momento de su consumo de al menos 10^6 ufc por g o mL [Roy, D. (2001) Int. J. Food Microbiol. 69:167–182].

30

Para la cuantificación de las bacterias del yogur, existe una Norma Internacional ISO/IDF [ISO/FDIS 9232|IDF146:2002] que establece las

condiciones para la cuantificación de estos microorganismos y se basa en una técnica de recuento de colonias de *S. thermophilus* en agar M-17 [Terzaghi, B. E. y Sandine, W. E. (1975) Appl. Microbiol. 29:807–813], adicionado con lactosa, después de su incubación en aerobiosis a 37 °C durante 48 h. Para *L.*

5 *bulgaricus*, se establece el recuento de colonias en agar MRS [de Man, J. C., Rogosa, M. y Sharpe, E. (1960) J. Appl. Bacteriol. 23:130–135] con glucosa y acidificado a pH 5,4, después de su incubación en anaerobiosis a 37 °C durante 72 h. En relación a la cuantificación de otros tipos de microorganismos presentes en leches fermentadas en mezcla con los microorganismos del

10 yogur, no existen Normas Internacionales o estándares, aunque existen grupos de trabajo que actualmente llevan a cabo estudios colaborativos para el desarrollo de dichas normas oficiales. En este sentido, en la Federación Internacional de Lechería (IDF/FIL) se trabaja en la validación de un método de cuantificación de *L. acidophilus* [ISO/CD 20128 / IDF 192] pero con adición de

15 clindamicina, y en una propuesta para la formación de un grupo de trabajo para la cuantificación de *Bifidobacterium*. En el mismo sentido, existen en la literatura científica diferentes estudios que analizan la posible diferenciación y cuantificación de las nuevas especies de bacterias añadidas al yogur, fundamentalmente *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. y *L. casei* [revisiones

20 sobre estos estudios: Charteris, W.P., Nelly, P. M., Morelli, L. y Collins, K (1997) Int. J. Food Microbiol. 35:1–27; Roy, 2001]. En general, los medios propuestos para la diferenciación de los tres grupos bacterianos mencionados entre sí y frente a las bacterias del yogur basan su selectividad en las diferentes condiciones de crecimiento de las especies en estudio y

25 básicamente en la adición de diferentes antibióticos (vancomicina, ácido nalidíxico, dicloxacilina, etc.) [Vinderola, C. G. y Reinheimer, J. A. (2000) 271–275; Bonaparte, C., Klein, G., Kneifel, W. y Reuter, G. (2001) Lait 81:227–235; Tharmaraj, N. y Shah, N. P. (2003) J. Dairy Sci. 86:2288–2296]. Recientemente, se ha publicado un estudio que compara diferentes medios de

30 cultivo selectivos y diferenciales descritos en la literatura para la cuantificación en yogures comerciales de las mismo cinco especies objeto de la presente invención [Talwalkar, A. y Kailasapathy, K. (2004) Int. Dairy J. 14:143-149]. El estudio concluye que ninguno de los medios selectivos descritos en la literatura

permite una cuantificación fehaciente de estos microorganismos cuando se encuentran mezclados en diferentes combinaciones en las leches fermentadas analizadas. Adicionalmente, el empleo de antibióticos en los medios de cultivo suele causar en la propia población seleccionada un cierto grado de reducción de los recuentos obtenidos [Roy, 2001], lo cual puede conducir a la subestimación de dicha población bacteriana y, en su caso, podría comprometer la valoración de la calidad del producto ensayado y/o de su potencial beneficio probiótico.

Existen trabajos publicados que describen el desarrollo de medios selectivos o diferenciales para la cuantificación de las especies citadas basados sólo en la diferenciación de las especies en estudio por su capacidad para fermentar la fuente de carbono presente en el medio de cultivo, por ejemplo rafinosa para la selección de *Bifidobacterium* [Hartemink, R., Kok, B. J., Weenk, G. H. y Rombouts, F. M. (1996) *J. Microbiol. Meth.* 27:33–43] o empleo de condiciones selectivas de incubación p. ej. selección de *L. casei* por incubación a 15 °C [Champagne, C. P., Roy, D. y Lafond, A. (1997) *Biotechnol. Techniques* 11:567–569]. Aunque los medios citados se han demostrado efectivos, en ambos casos la especie ensayada estaba sola en mezcla con los microorganismos del yogur o en otros ejemplos en mezclas sólo de especies termófilas de *Lactobacillus* [Camaschella, P., Mignot, O., Pirovano, F, Sozzi, T. (1998) *Lait* 78:461–467].

En general, muchos de los trabajos publicados en revistas científicas que describen la cuantificación de lactobacilos y/o bifidobacterias en cultivos mixtos presentes en leches fermentadas carecen del análisis de los diferentes parámetros que permiten la validación de los métodos desarrollados y/o de los estudios necesarios para la confirmación de la autenticidad de los resultados obtenidos.

30

En relación a las patentes internacionales existentes relacionadas con el tema objeto de la presente invención, se destacan las patentes JP60114188 y JP92029359, publicadas en 1983, y la patente JP11028098, publicada en

1997, desarrolladas por la empresa Yakult Honska KK, que se caracterizan por emplear galacto-oligosacáridos como fuente de carbono para seleccionar bifidobacterias cuando se encuentran en mezcla con bacterias lácticas. No obstante, no existe ningún método patentado para la detección discriminativa fiable de las bacterias del yogur en mezcla con lactobacilos y bifidobacterias probióticos, situación habitualmente frecuente en leches fermentadas comerciales.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN:

10 - Breve descripción de la invención

Se ha desarrollado un procedimiento que permite la cuantificación selectiva y diferencial de cuatro especies de bacterias lácticas (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. acidophilus*) y de *B. lactis* en cultivos mixtos presentes en leches fermentadas. La novedad del procedimiento y lo que le aventaja respecto de los existentes es que puede distinguir simultáneamente tres especies diferentes de lactobacilos entre sí y frente a otra bacteria láctica como *S. thermophilus* y a bifidobacterias, todo ello basado en el empleo de diferentes condiciones de incubación y/o en la diferenciación por morfología de las colonias, pero sin adición de antibióticos a los medios de cultivo que pudieran comprometer la viabilidad de las especies en estudio. La validación del procedimiento se ha realizado en base al estudio de la selectividad de los medios, la exactitud y precisión para recuperar la población ensayada, la reproducibilidad del procedimiento y el análisis de la posible competencia entre las especies. También se ha analizado el efecto matricial mediante la cuantificación de las poblaciones en leche acidificada en comparación con los medios de cultivo de referencia. La confirmación de la identidad de las colonias obtenidas en los medios propuestos se ha realizado según procedimiento descrito en la patente Procedimiento para la detección e identificación específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y en cultivos iniciadores para leches fermentadas.

- Descripción detallada de la invención

El procedimiento de cuantificación selectiva y diferencial de las especies bacterianas *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. acidophilus* y *B. lactis* en cultivos mixtos presentes en leches fermentadas se basa en el empleo de características selectivas de crecimiento y en diferencias morfológicas de las colonias obtenidas en las condiciones de cultivo propuestas. En ningún caso se utilizan antibióticos como agentes selectivos de crecimiento. Los medios de cultivo basales utilizados han sido M-17 para *S. thermophilus* y MRS de fermentación para lactobacilos y *B. lactis*, descritos en la Norma Oficial de Análisis de las bacterias del yogur [ISO/FDIS 9232|IDF146:2002]. Su procedencia comercial ha sido de Laboratorios Conda, Madrid.

El crecimiento diferencial se ha basado en la utilización selectiva de fuentes de carbono como glucosa, lactosa, rafinosa, maltosa y fructosa, en las diferentes temperaturas y tiempos de incubación como 30, 37 y 45 °C durante 24 y 72 h y en la presencia de oxígeno: aerobiosis, atmósfera parcial de CO₂, anaerobiosis. También se han diferenciado las especies por el tamaño y la morfología de las colonias obtenidas en los medios, considerándose sólo resultado positivo las colonias de tamaño igual o superior a 2 mm.

De esta manera, la cuantificación de *S. thermophilus* se ha realizado mediante crecimiento en M-17 agar con lactosa en condiciones de incubación en aerobiosis, durante 24 h y a 45 °C.

L. bulgaricus se cuantifica empleando agar MRS con fructosa e incubación en anaerobiosis durante 72 h a 45 °C. Las colonias obtenidas tienen forma de lenteja y tamaño superior a 2 mm, claramente diferenciables de las colonias rugosas correspondientes a *L. acidophilus* y las colonias puntiformes de *B. lactis*.

Para la cuantificación de *L. acidophilus*, se utiliza agar MRS con maltosa e incubación en atmósfera de 20% de CO₂ durante 72 h a 37 °C. La formación de

colonias rugosas y traslúcidas de tamaño superior a 2 mm diferencia esta especie de *L. casei*, caracterizada por la formación de colonias redondas y blancas.

- 5 La cuantificación de *L. casei* se realiza mediante crecimiento en agar MRS con glucosa e incubación en aerobiosis durante 72 h a 30 °C.

Finalmente, *B. lactis* se selecciona por la fermentación de rafinosa presente en MRS agar, la tolerancia a LiCl y por las condiciones de incubación en
10 anaerobiosis durante 72 h y a 45 °C.

Para la validación del procedimiento de cuantificación de cada especie se han seguido recomendaciones de la Norma ISO/TR 13843:2000 y se han determinado los siguientes parámetros:

15

Precisión y Exactitud: Se han evaluado los métodos de cultivo propuestos frente a las condiciones óptimas de crecimiento de cada especie que se han considerado como métodos de referencia. Se han comparado los valores de los recuentos obtenidos para cada especie con los métodos de referencia y los
20 obtenidos con los métodos propuestos mediante la prueba t de Student para lo que se ha comparado la t tabulada para n-1 grados de libertad y 95% de nivel de confianza con la t calculada a partir de los resultados obtenidos. Los resultados proceden de al menos tres repeticiones y han indicado que no existen diferencias significativas entre los valores de referencia y los obtenidos
25 con los métodos propuestos, ya que para todas las especies la t calculada ha sido inferior a la t tabulada. Además, se han obtenido con los métodos propuestos porcentajes de recuperación para cada especie superiores al 90%.

La precisión de los métodos propuestos es alta ya que la desviación estándar
30 relativa de las diferencias entre los valores del método propuesto y los valores de referencia para cada especie ha sido inferior a 0,2 unidades logarítmicas y siempre mejor que la obtenida de una distribución de Poisson. La precisión del procedimiento también se analizó en función de la reproducibilidad de

resultados mediante análisis de las mismas muestras por dos operarios diferentes. Además, se incorporó al análisis el efecto de la matriz, en este caso leche acidificada a pH 4,6, y el efecto de diferentes niveles de inóculo, a dosis baja (1×10^4 ufc/ml) y a dosis alta (1×10^6 ufc/ml). La desviación estándar
5 relativa de reproducibilidad de los resultados obtenidos por los dos operarios fue igual o inferior a 0,02 unidades logarítmicas para las especies analizadas.

Selectividad.- Para la evaluación de la selectividad de los medios propuestos y del efecto de la presencia de competidores se combinaron todas las especies
10 al mismo nivel de inóculo (1×10^7 ufc/ml) y se observó que todos los medios selectivos o diferenciales presentaban una selectividad de alrededor del 100% para cada una de las especies analizadas. Cuando cada una de las especies se añadió a leche acidificada a pH 4,6 a dosis baja (1×10^4 ufc/ml) junto con el resto de las otras cuatro especies, cada una a dosis alta (1×10^6 ufc/ml), se
15 obtuvo para los métodos propuestos una especificidad del 100% para cada una de las especies evaluadas. Los resultados indican, por tanto, que la cuantificación de cada una de las especies en los respectivos medios propuestos no se ve afectada por la presencia de las otras especies.

20 Identificación.- La verificación de la identidad de las especies se realizó mediante identificación de un 10% de colonias obtenidas en los diferentes medios selectivos y diferenciales según el procedimiento que se describe en la patente Procedimiento para la detección e identificación específicas de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas

25 La principal aplicación industrial del procedimiento desarrollado es el análisis microbiológico cuantitativo de diferentes especies de bacterias lácticas y bifidobacterias en yogures y leches fermentadas que contengan cultivos mixtos de estas bacterias, con el objeto de determinar los niveles de viabilidad en el
30 producto que respondan, por un lado, a los valores requeridos por la legislación para las bacterias del yogur y, por otro lado, a los recomendados para las bacterias probióticas.

Descripción detallada del contenido de las figuras.

- Breve descripción del contenido de las figuras.

La Fig. 1 muestra las diferencias de morfología entre las colonias de *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* y *B. lactis*. La Fig. 2 muestra las diferencias de morfología entre las colonias de *L. acidophilus* y *L. casei*.

Figura 1: diferencias de morfología entre las colonias de *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* y *B. lactis*. Se muestran las colonias obtenidas a partir de una dilución de la mezcla de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei* y *B. lactis* sembrada en profundidad y después de su incubación en agar MRS con fructosa durante 72 h a 45 °C y en anaerobiosis. Las colonias corresponden a *L. bulgaricus* con morfología de lenteja y tamaño superior a 2 mm de diámetro, *L. acidophilus* que forma colonias rugosas y tamaño superior a 2 mm y a colonias puntiformes correspondientes a *B. lactis*.

Figura 2: diferencias de morfología entre las colonias de *L. acidophilus* y *L. casei*.

Se muestran las colonias obtenidas a partir de una dilución de la mezcla de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei* y *B. lactis* sembrada en superficie y después de su incubación en agar MRS con maltosa durante 72 h a 37 °C y en estufa de CO₂. Las colonias transparentes y rugosas de al menos 2 mm de diámetro corresponden a *L. acidophilus* y las colonias redondas y blancas de tamaño superior a 2 mm corresponden a *L. casei*.

25 EJEMPLO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION:

Ejemplo de cuantificación selectiva y diferencial de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei* y *B. lactis* en leche fermentada analizada durante 28 días de conservación a 4 °C.

El procedimiento para el recuento selectivo y diferencial de la mezcla de estas cinco especies se ha aplicado a una leche fermentada comercial que indicaba en la etiqueta que contenía dichas especies.

La muestra de leche fermentada (1 ml) se homogeneizó con 9 ml de solución Ringer, que contenía 0,5 g/L de cisteína, para obtener la primera dilución decimal a partir de la cual se hicieron diluciones decimales seriadas y se inocularon tres diluciones y por duplicado en las siguientes condiciones:

5

- *S. thermophilus*: siembra de 1 ml en profundidad de las diluciones apropiadas en placas Petri a las que se añadieron 15 ml de agar M-17 (Conda) que contenía 5 g/L de lactosa. Las placas se incubaron 24 h en aerobiosis a 45 °C. El medio es selectivo y se cuentan todas las colonias, cuyo aspecto es de lenteja de tamaño igual o superior a 2 mm.
- 10 • *L. bulgaricus*: siembra de 1 ml en profundidad de las diluciones apropiadas en placas Petri a las que se añadieron 15 ml de agar MRS para fermentación (Conda) que contenía 10 g/L de fructosa, 8 g/L de casaminoácidos, 2 g/L de Tween 80 y 0,5 g/L de cisteína. Las placas se incubaron 72 h en anerobiosis a 45 °C. El medio es diferencial y se cuentan las colonias con forma de lenteja y tamaño igual o superior a 2 mm, perfectamente diferenciables de las colonias rugosas de tamaño superior a 2 mm correspondientes a *L. acidophilus* y de las colonias puntiformes correspondientes a *B. lactis* (ver foto de Fig. 1).
- 15 • *L. acidophilus*: siembra de 0,1 ml en superficie de las diluciones apropiadas en placas Petri que contenían 15 ml de agar MRS para fermentación (Conda) al que se añadieron 5 g/L de maltosa, 8 g/L de casaminoácidos y 0,5 g/L de cisteína. Las placas se incubaron 72 h en estufa de CO₂ a 37 °C. El medio es diferencial y se cuentan las colonias rugosas y traslúcidas de tamaño igual o superior a 2 mm, perfectamente diferenciables de las colonias redondas y blancas de tamaño igual o superior a 2 mm correspondientes a *L. casei* (ver foto de Fig. 2).
- 20 • *L. casei*: siembra de 1 ml en profundidad de las diluciones apropiadas en placas Petri a las que se añadieron 15 ml de agar MRS para fermentación (Conda) que contenía 5 g/L de glucosa. Las placas se incubaron 72 h en aerobiosis a 30 °C. El medio es selectivo y se cuentan todas las colonias, cuyo aspecto es de lenteja de tamaño igual o superior a 2 mm.
- 25
- 30

- *B. lactis*: siembra de 1 ml en profundidad de las diluciones apropiadas en placas Petri a las que se añadieron 15 ml de agar MRS para fermentación (Conda) que contenía 5 g/L de rafinosa, 8 g/L de casaminoácidos, 0,5 g/L de LiCl y 0,5 g/L de cisteína. Las placas se incubaron 72 h en anaerobiosis a 45 °C. El medio es selectivo y se cuentan todas las colonias, cuyo aspecto es de lenteja de tamaño igual o superior a 2 mm.

Los recuentos que se obtuvieron de leches fermentadas en diferentes etapas de conservación (inicio, medio y fin de caducidad) aparecen en la Tabla 1.

10

Tabla 1. Recuentos de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei* y *B. lactis* en leche fermentada etiquetada que contiene estas especies y analizada hasta su fecha de caducidad (conservación a 4 °C durante 28 días).

Especie	Recuentos (ufc/ml) en leche fermentada conservada a 4 °C			
	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas
<i>S. thermophilus</i>	$2,12 \times 10^9$	$1,51 \times 10^9$	$1,73 \times 10^9$	$1,67 \times 10^9$
<i>L. bulgaricus</i>	$3,01 \times 10^7$	$1,77 \times 10^7$	$4,30 \times 10^7$	$6,42 \times 10^6$
<i>L. acidophilus</i>	$1,55 \times 10^7$	$1,61 \times 10^7$	$8,03 \times 10^6$	$3,79 \times 10^6$
<i>L. casei</i>	$3,24 \times 10^6$	$3,55 \times 10^6$	$3,19 \times 10^6$	$3,27 \times 10^6$
<i>B. lactis</i>	$1,24 \times 10^8$	$1,21 \times 10^8$	$1,02 \times 10^8$	$1,35 \times 10^8$

15

REIVINDICACIONES:

- 5 1. Procedimiento para diferenciar y cuantificar bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas a partir de una muestra de leche o de cultivo caracterizado por emplear medios de cultivo con componentes específicos y libres de antibióticos en combinación con condiciones de crecimiento específicas para *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei* y *B. lactis* tanto se encuentren en mezcla de las cinco especies como en las diferentes combinaciones binarias, 10 ternarias o cuaternarias obtenidas a partir de las cinco especies, de modo que el medio, condiciones de cultivo y morfología de las colonias determinan la especie y la cuantificación se realiza por diluciones decimales.
- 15 2. Procedimiento para diferenciar y cuantificar bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas a partir de una muestra de leche o de cultivo según la reivindicación 1 caracterizado porque los componentes específicos del medio de cultivo comprenden fuentes de carbono por los que las especies indicadas presentan diferente capacidad fermentativa.
- 20 3. Procedimiento para diferenciar y cuantificar bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas a partir de una muestra de leche o de cultivo según las reivindicaciones 1 y 2 caracterizado porque las condiciones de cultivo comprenden las condiciones ambientales de incubación 25 relativas a duración, temperatura y porcentaje de oxígeno en la atmósfera.
- 30 4. Procedimiento para diferenciar y cuantificar bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas a partir de una muestra de leche o de cultivo según las reivindicaciones 1 a 3 caracterizado porque se utilizan tres diluciones de la muestra para la siembra por duplicado en los medios específicos.

5. Procedimiento para diferenciar y cuantificar bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas a partir de una muestra de leche o de cultivo según las reivindicaciones 1 a 4 caracterizado por comprender
- 5 a. *La identificación y cuantificación de colonias con forma de lenteja y tamaño igual o superior a 2 mm correspondientes a S. thermophilus* al incubar la muestra en medio con lactosa y en condiciones de cultivo de aerobiosis, durante 24 h y a una temperatura de 45 °C.
- 10 b. *La identificación y cuantificación de colonias con forma de lenteja y tamaño igual o superior a 2 mm correspondientes a L. bulgaricus* al incubar la muestra en medio con fructosa y 2 g/L de Tween 80 en condiciones de cultivo de anaerobiosis, durante 72 h y a una temperatura de 45 °C.
- 15 c. *La identificación y cuantificación de colonias rugosas y traslúcidas y con tamaño igual o superior a 2 mm correspondientes a L. acidophilus* al incubar la muestra en medio con maltosa y en condiciones de cultivo de 20% de CO₂, durante 72 h y a una temperatura de 37 °C.
- 20 Indistintamente se podrían identificar y cuantificar colonias rugosas de tamaño igual o superior a 2 mm correspondientes a *L. acidophilus* del caso b.)
- 25 d. *La identificación y cuantificación de colonias con forma de lenteja de tamaño igual o superior a 2 mm correspondientes a L. casei* al incubar la muestra en medio con glucosa en condiciones de cultivo de aerobiosis, durante 72 h y a una temperatura de 30 °C. Indistintamente se podrían identificar y cuantificar colonias redondas y blancas de tamaño igual o superior a 2 mm correspondientes a *L. casei* del caso c.)
- 30 e. *La identificación y cuantificación de colonias con forma de lenteja de tamaño igual o superior a 2 mm correspondientes a B. lactis* al incubar la muestra en medio con rafinosa y 0,5

g/L de LiCl en condiciones de cultivo de anaerobiosis, durante 72 h y a una temperatura de 45 °C.

6. Procedimiento para diferenciar y cuantificar bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas a partir de una muestra de leche o de cultivo según las reivindicaciones 1 a 4 caracterizado por comprender
- 5
- a. *La identificación y cuantificación de colonias con forma de lenteja de tamaño igual o superior a 2 mm correspondientes a S. thermophilus* al incubar 1 ml de la dilución de la muestra en 15 ml de agar M-17 conteniendo 5 g/L de lactosa mediante siembra en profundidad y en condiciones de cultivo de aerobiosis, durante 24 h y a una temperatura de 45 °C
- 10
- b. *La identificación y cuantificación de colonias con forma de lenteja y tamaño igual o superior a 2 mm correspondientes a L. bulgaricus* al incubar 1 ml de la dilución de la muestra en 15 ml de agar MRS para fermentación conteniendo 10 g/L de fructosa, 8 g/L de casaminoácidos, 0,5 g/L de cisteína y 2 g/L de Tween 80 mediante siembra en profundidad y en condiciones de cultivo de anaerobiosis, durante 72 h y a una temperatura de 45 °C.
- 15
- c. *La identificación y cuantificación de colonias rugosas y traslúcidas y con tamaño igual o superior a 2 mm correspondientes a L. acidophilus* al incubar 0,1 ml de la dilución de la muestra en 15 ml de agar MRS para fermentación conteniendo 5 g/L de maltosa, 8 g/L de casaminoácidos y 0,5 g/L de cisterna mediante siembra en superficie y en condiciones de cultivo de 20% de CO₂, durante 72 h a una temperatura de 37 °C en estufa de CO₂.
- 20
- Indistintamente se podrían identificar y cuantificar colonias rugosas de tamaño igual o superior a 2 mm correspondientes a *L. acidophilus del caso b.*)
- 25
- 30

- 5 d. *La identificación y cuantificación* de colonias con forma lenteja de tamaño igual o superior a 2 mm correspondientes a *L. casei* al incubar 1 ml de la dilución de la muestra en 15 ml de agar MRS para fermentación
conteniendo 5 g/L de glucosa mediante siembra en profundidad y en condiciones de cultivo de aerobiosis, durante 72 h y a una temperatura de 30 °C. Indistintamente se podrían identificar y cuantificar colonias redondas y blancas de tamaño igual o superior a 2 mm correspondientes a *L. casei del caso c.)*
- 10 e. *La identificación y cuantificación* de colonias con forma de lenteja y tamaño igual o superior a 2 mm *correspondientes a B. lactis* al incubar 1 ml de la dilución de la muestra en 15 ml de agar MRS para fermentación conteniendo 5 g/L de rafinosa, 8 g/L de casaminoácidos, 0,5 g/L de LiCl y 0,5 g/L de cisteína mediante siembra en profundidad y en condiciones de cultivo de anaerobiosis, durante 72 h y a una temperatura de 45 °C
- 15
- 20 7. Procedimiento para diferenciar y cuantificar bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas a partir de una muestra de leche o de cultivo según las reivindicaciones 1 a 6 caracterizado porque se ha validado siguiendo recomendaciones de la Norma ISO/TR 13843:2000.
- 25 8. Procedimiento para diferenciar y cuantificar bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas a partir de una muestra de leche o de cultivo según la reivindicación 7 caracterizado porque la recuperación relativa en todas las especies es superior al 90% de la cuantificación obtenida.
- 30 9. Procedimiento para diferenciar y cuantificar bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas a partir de una muestra de leche o de cultivo según la reivindicación 7 caracterizado porque la cuantificación selectiva es

efectiva (al 100%) cuando se combinan todas las especies al mismo nivel de inóculo (1×10^7 ufc/ml).

- 5 10. Procedimiento para diferenciar y cuantificar bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas a partir de una muestra de leche o de cultivo según la reivindicación 7 caracterizado porque la cuantificación selectiva es efectiva (al 100%) cuando se evalúa cada una de las especies en leche acidificada a pH 4,6 (efecto matricial) a dosis baja (1×10^4 ufc/ml) combinada junto con el resto de las otras cuatro especies, cada una a dosis alta (1×10^6 ufc/ml).
- 10 11. Procedimiento para diferenciar y cuantificar bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas a partir de una muestra de leche o de cultivo según la reivindicación 7 caracterizado porque la cuantificación no difiere de los métodos de referencia según el análisis de comparación T de Student, n-1 grados de libertad y 95% de nivel de confianza, su desviación estándar relativa es igual o inferior a 0,2 unidades logarítmicas y porque es mejor que la obtenida de una distribución de Poisson.
- 15 12. Procedimiento para diferenciar y cuantificar bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas a partir de una muestra de leche o de cultivo según la reivindicación 7 caracterizado porque cuando se estudia el efecto matricial, la desviación estándar relativa de reproducibilidad de los resultados, obtenidos por dos operarios, es igual o inferior a 0,02 unidades logarítmicas cuando se analiza cada una de las especies en leche acidificada a pH 4,6 a dosis baja (1×10^4 ufc/ml).
- 20 25 13. Procedimiento para diferenciar y cuantificar bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas a partir de una muestra de leche o de cultivo según la reivindicación 7 caracterizado porque cuando se estudia el efecto matricial, la desviación estándar relativa de reproducibilidad de los resultados, obtenidos por dos operarios, es igual o inferior a 0,02
- 30

unidades logarítmicas cuando se analiza cada una de las especies en leche acidificada a pH 4,6 a dosis alta (1×10^6 ufc/ml).

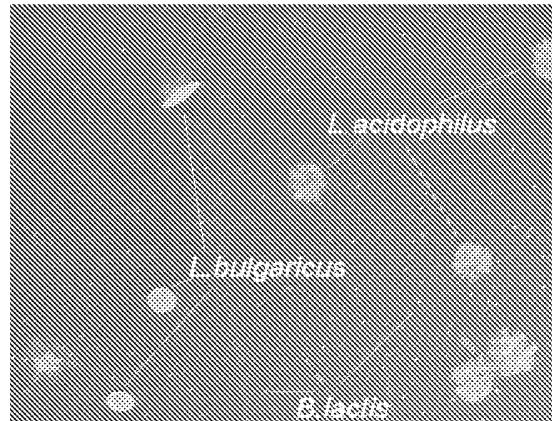


Fig. 1

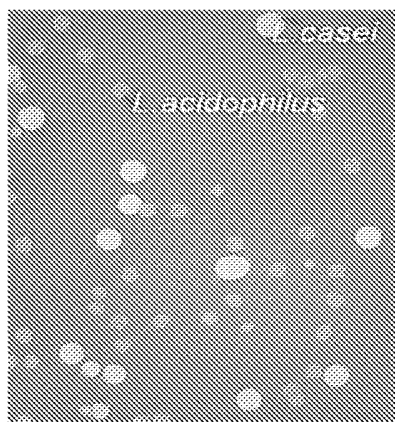


Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2007/070123

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, TXTE, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HANNON J.A. et al. Lysis of starters in UF cheeses : behaviour of mesophilic lactococci and thermophilic lactobacilli. International Dairy Journal. April 2006, Vol. 16, pages 324-334. ISSN 0958-6946.	5,6
X	SHAH N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. Journal of Dairy Science. 2000, Vol. 83, N° 4, pages 894-907.	5,6

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 November 2007 (13.11.2007)

Date of mailing of the international search report

(16/11/2007)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

M. Cumbreño Galindo

Telephone No. +34 91 349 96880

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2007/070123

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GUEIMONDE M. et al. Viability and diversity of probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium populations included in commercial fermented milks. Food Research International. April 2004, Vol. 37, pages 839-850. ISSN 0963-9969.	5,6
A	HARTEMINK R. et al. Raffinose-Bifidobacterium (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria. Journal of Microbiological Methods. 1996, Vol. 27, pages 33-43. ISSN 0167-7012.	5,6

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.: 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12 and 13 and claim 10 (in part)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12 and 13 and claim 10 (in part) do not clearly define the subject matter for which protection is sought, since they do not refer to any technical features. The subject matter of claims 5 and 6 (in part) does not meet the requirements for clarity and concision pursuant to PCT Article 6 to such an extent that it is not possible to carry out a meaningful search on the basis of these claims.
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/46 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

C12R 1/23 (2006.01)

C12R 1/245 (2006.01)

The present application concerns the identification and quantification of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* micro organisms in fermented milk and starter cultures of fermented milk. With this in mind, the sample is inseminated and cultivated in five different culture media with distinct culture conditions, each of the five variants being the optimum variant for detecting one of the aforementioned species. In order for the invention to have unity of invention, the method for detecting the five micro organisms must have at least one stage or feature that is common to the five. Since the description indicates that the detection of each of them is carried out in specific conditions and independently from the rest, there does not appear to be any technical relationship which integrates the detection of the five micro organisms under one general inventive concept pursuant to PCT Rule 13.1. The administration charged with the international search therefore considers that there are five inventions covered by the following claims:

Invention 1: method for identifying and quantifying *Streptococcus thermophilus*, which includes the insemination of the sample at depth in M17 agar containing 5 g/l lactose and incubation in aerobiosis conditions for 24 hours at 45°C (claims 5a, 6a and part of 10).

Invention 2: method for identifying and quantifying *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, which includes the insemination of the sample in MRS agar with 10 g/l fructose, 8 g/l casamino acids, 0.5 g/l cysteine and 2 g/l of Tween 80 by means of insemination at depth in anerobiosis culture conditions for 72 hours at 45°C (claims 5b, 6b and part of 10).

Invention 3: method for identifying and quantifying *Lactobacillus acidophilus*, which includes the insemination of the sample in MRS agar with 5 g/l maltose, 8 g/l casamino acids and 0.5 g/l cysteine, the insemination taking place at the surface and in culture conditions of 20% CO₂ at 37°C for 72 hours (claims 5c, 6c and part of 10).

Invention 4: method for identifying and quantifying *Lactobacillus casei*, which includes the insemination at depth of the sample in MRS agar with 5 g/l glucose and in aerobiosis culture conditions for 72 hours at 30°C (claims 5d, 6d and part of 10).

Invention 5: method for identifying and quantifying *Bifidobacterium lactis*, which includes the insemination at depth of the sample in MRS agar with 5 g/l raffinose, 8 g/l casamino acids, 0.5 g/l LiCl and 0.5 g/l cysteine in anaerobiosis culture conditions for 72 hours at 45°C (claims 5e, 6e and part of 10).

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 2007/070123

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12N, C12R

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, TXTE, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	HANNON J.A. et al. Lysis of starters in UF cheeses : behaviour of mesophilic lactococci and thermophilic lactobacilli. International Dairy Journal. Abril 2006, Vol. 16, páginas 324-334. ISSN 0958-6946.	5,6
X	SHAH N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. Journal of Dairy Science. 2000, Vol. 83, Nº 4, páginas 894-907.	5,6

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	“&” documento que forma parte de la misma familia de patentes.
“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 13 Noviembre 2007 (13.11.2007)	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 16 de noviembre de 2007 (16/11/2007)
---	---

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Nº de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado M. Cumbreño Galindo Nº de teléfono +34 91 349 96880
--	--

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2007/070123

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. Las reivindicaciones n^{os}:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. Las reivindicaciones n^{os}: 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12 y 13 y las reivindicaciones 5, 6 y 10 (parcialmente) se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
Las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12 y 13 y la reivindicación 10 (parcialmente) no definen claramente el objeto cuya protección se pretende ya que no hacen referencia a características técnicas. El objeto de las reivindicaciones 5 y 6 (parcialmente) no alcanza a cumplir los requisitos de claridad y concisión del Art. 6 del PCT, hasta tal extremo que una búsqueda significativa basada en esas reivindicaciones, no es posible.

3. Las reivindicaciones n^{os}:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:
Ver página adicional

1. Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.

3. Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n^{os}:

4. Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n^{os}:

Indicación en cuanto a la protesta Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
 Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
 El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

C (continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	GUEIMONDE M. et al. Viability and diversity of probiotic <i>Lactobacillus</i> and <i>Bifidobacterium</i> populations included in commercial fermented milks. Food Research International. Abril 2004, Vol. 37, páginas 839-850. ISSN 0963-9969.	5,6
A	HARTEMINK R. et al. Raffinose-Bifidobacterium (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria. Journal of Microbiological Methods. 1996, Vol. 27, páginas 33-43. ISSN 0167-7012.	5,6

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/46 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

C12R 1/23 (2006.01)

C12R 1/245 (2006.01)

La presente solicitud tiene por objeto la identificación y cuantificación de los microorganismos *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium lactis* en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas. Con tal fin, se procede a la siembra y cultivo de la muestra en cinco medios de cultivo diferentes con distintas condiciones de cultivo, siendo cada una de las cinco variantes la óptima para la detección de una de las especies anteriormente citadas. Para que la invención tenga unidad de invención, el método de detección de los cinco microorganismos ha de comprender al menos una etapa o característica común a los cinco. Dado que de la descripción se desprende que la detección de cada uno de ellos se realiza en condiciones específicas para el mismo y de manera independiente al resto, no se puede apreciar ninguna relación técnica que integre la detección de los cinco microorganismos bajo un único concepto inventivo general según la regla 13.1 del PCT. En consecuencia, la Administración encargada de la búsqueda internacional considera que hay cinco invenciones cubiertas por las siguientes reivindicaciones:

Invención 1ª: Procedimiento de identificación y cuantificación de *Streptococcus thermophilus* que comprende la siembra de la muestra en profundidad en agar M-17 conteniendo 5 g/l de lactosa e incubándose en condiciones de aerobiosis durante 24 h a 45 °C (reivindicaciones 5a, 6a y parte de la 10).

Invención 2ª: Procedimiento de identificación y cuantificación de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que comprende la siembra de la muestra en agar MRS con 10 g/l de fructosa, 8 g/l de casaminoácidos, 0,5 g/l de cisteína y 2 g/l de tween 80 mediante siembra en profundidad y en condiciones de cultivo de anaerobiosis, durante 72 h a 45 °C (reivindicaciones 5b, 6b y parte de la 10).

Invención 3ª: Procedimiento de identificación y cuantificación de *Lactobacillus acidophilus* que comprende la siembra de la muestra en agar MRS con 5 g/l de maltosa, 8 g/l de casaminoácidos y 0,5 g/l de cisteína, efectuándose la siembra en superficie y en condiciones de cultivo de 20% de CO₂, a 37 °C durante 72 h (reivindicaciones 5c, 6c y parte de la 10).

Invención 4ª: Procedimiento de identificación y cuantificación de *Lactobacillus casei* que comprende la siembra en profundidad de la muestra en agar MRS con 5 g/l de glucosa y en condiciones de cultivo de aerobiosis, durante 72 h a 30 °C (reivindicaciones 5d, 6d y parte de la 10).

Invención 5ª: Procedimiento de identificación y cuantificación de *Bifidobacterium lactis* que comprende la siembra de la muestra en profundidad en agar MRS con 5 g/l de rafinosa, 8 g/l de casaminoácidos, 0,5 g/l de LiCl y 0,5 g/l de cisteína, en condiciones de cultivo de anaerobiosis, durante 72 h a 45 °C (reivindicaciones 5e, 6e y parte de la 10).