

(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 2008/003811 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C12P 19/34 (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/ES2007/070124

(22) Fecha de presentación internacional:

2 de Julio de 2007 (02.07.2007)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P200601788 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 Frio, C/José Antonio Novais, E-28040 Madrid (ES). **PAARUP, Torsten** [DK/ES]; Instituto Del Frio, C/José Antonio Novais, E-28040 Madrid (ES). **JANER OTERO, Carolina** [ES/ES]; Instituto Del Frio, C/José Antonio Novais, E-28040 Madrid (ES). **PELÁEZ MARTÍNEZ, Carmen** [ES/ES]; Instituto Del Frio, C/José Antonio

Novais, E-28040 Madrid (ES). **REQUENA ROLANÍA, Teresa** [ES/ES]; Instituto Del Frio, 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 SPECIFIC SIMULTANEOUS IDENTIFICATION AND DETECTION OF LACTIC ACID BACTERIA AND BIFIDOBACTERIA IN FERMENTED MILKS AND STARTER CULTURES FOR FERMENTED MILKS

(54) Título: PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN SIMULTÁNEA Y ESPECÍFICA DE BACTERIAS LÁCTICAS Y BIFIDOBACTERIAS EN LECHES FERMENTADAS Y EN CULTIVOS INICIADORES PARA LECHES FERMENTADAS

(57) Abstract: The invention relates to a method for the specific simultaneous identification and detection of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milks and starter cultures for fermented milks. The method can be used for the rapid and simultaneous detection and identification of different species of lactic acid bacteria (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. acidophilus*) in mixed cultures with *B. lactis*, species usually found in yogurt and fermented milks containing probiotics. The method uses specific DNA primers designed from the 16S rRNA gene for lactic acid bacteria and from the gene of the transaldolase for bifidobacteria. The PCR-based specific amplification identification method is complemented by the separation of the amplified products using denaturing gradient polyacrylamide gel electrophoresis (DGGE). The method is advantageous in that it can identify all of the mixed cultures present in fermented milks in a single reaction.

(57) Resumen: Procedimiento para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y en cultivos iniciadores para leches fermentadas. El procedimiento permite la rápida y simultánea detección e identificación de diferentes especies de bacterias lácticas (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. acidophilus*) en cultivos mixtos con *B. lactis*, especies habitualmente presentes en yogur y leches fermentadas que contienen probióticos. El procedimiento emplea cebadores de ADN específicas 10 diseñados a partir del gen 16S rRNA para las bacterias lácticas y del gen de la transaldolasa para bifidobacterias. El procedimiento de identificación mediante amplificación específica por PCR se complementa con la separación de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante (DGGE). La ventaja del método radica en que es capaz de realizar en una sola reacción la identificación conjunta de los cultivos mixtos presentes en leches fermentadas.

WO 2008/003811 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 la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y en cultivos iniciadores para leches fermentadas.

5

SECTOR DE LA TÉCNICA:

La técnica se encuadra dentro del Área Agroalimentaria, en el Sector Lácteo, y desarrolla un procedimiento para la detección e identificación de diferentes especies de bacterias lácticas y bifidobacterias específicas de poblaciones mixtas en yogures y leches fermentadas.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA:

Dentro del sector lácteo, el consumo de productos lácteos probióticos se encuentra en franca expansión, creciendo durante los últimos años no sólo en ventas sino también en la variedad de productos que se ofertan. Este hecho ha conducido a que desde enero de 2004 se incluyan en las estadísticas del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación los datos sobre consumo de “yogur con bífidus” y “otras leches fermentadas”. El registro del volumen de consumo en España de yogures y leches fermentadas comparativo entre mayo de 2004 y mayo de 2005 indica un incremento medio del consumo de productos probióticos en un 18%, los cuales representan casi un 10% del total consumido de yogures y productos relacionados [http://www.fenil.org/Documentos/Sector/Consumo/CompAcumUltimoAno/consumo_comparativa_mayo05-04.pdf].

15

20

25

La detección y correcta identificación de los microorganismos empleados como probióticos comercialmente es de gran importancia para garantizar la autenticidad de su etiquetado y, en su caso, para apoyar las posibles alegaciones de salud de estos alimentos. Los estudios de productos probióticos presentes en el mercado han reflejado, en general, una falta de precisión en la identificación/taxonomía de los microorganismos probióticos empleados tanto en diferentes productos lácteos como en concentrados liofilizados y en preparados farmacéuticos/nutracéuticos [Fasoli, S., Marzotto, M., Rizzotti, L.,

30

Rossi, F., Dellaglio, F., Torriani, S. (2003) Int. J. Food Microbiol. 82:59–70; Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J. (2003) Int. J. Food Microbiol. 81:1–10]. Estudios recientes realizados sobre la diversidad de especies de lactobacilos y bifidobacterias presentes en leches fermentadas comercializadas en España indican una creciente mejora en la equivalencia entre las especies etiquetadas y las presentes en el producto detectadas por técnicas moleculares [Gueimonde, M., Delgado, S., Mayo, B., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C. G. (2004) Food Res. Int. 37:839–850]. Aún así, ninguna de las muestras analizadas en el estudio contenía más de una especie de lactobacilos probióticos y en la mayoría de leches fermentadas ni siquiera a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. La dificultad de estos estudios, por tanto, aumenta cuando concurren un mayor número de especies en el mismo producto.

La identificación tradicional de microorganismos basada en características fenotípicas es bastante lenta y no siempre adecuada para la correcta identificación o diferenciación entre especies muy próximas taxonómicamente. El reemplazo lógico sucedido en este aspecto ha sido el empleo de técnicas moleculares para complementar o sustentar la identificación de especies bacterianas. La mayoría de estas técnicas se han basado en el análisis de secuencias específicas presentes en genes integrantes del operón del ARN ribosómico y en las regiones intergénicas espaciadoras [Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1995) Microbiol. Rev. 59:143–169]. Este hecho se basa en el carácter universal del funcionamiento de estos genes que conduce a la presencia de regiones conservadas, amplificadas por cebadores universales, y de regiones variables que permiten establecer agrupaciones filogenéticas según el grado de homología de las secuencias nucleotídicas y, por tanto, la identificación de especies bacterianas. Sin embargo, la comparación de secuencias del gen 16S rRNA de bifidobacterias refleja una elevada analogía entre las especies (similitud que oscila entre 92 y 99%) que dificulta su diferenciación basada en el análisis de dicha secuencia, por lo que se han buscado otros genes polimórficos para la identificación de estas especies, como es el que codifica para la enzima transaldolasa [Requena, T., Burton, J.,

Matsuki, T., Munro, K., Simon, M.A., Tanaka, R., Tannock, G.W. (2002) Appl. Environ. Microbiol. 68:2420–2427].

La combinación de técnicas específicas para la detección e identificación bacteriana basada en técnicas moleculares como amplificación por PCR y
5 separación de los fragmentos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante (DGGE), constituye una herramienta de gran utilidad para el estudio de poblaciones microbiológicas complejas en ecosistemas naturales sin necesidad de realizar una separación previa de los diferentes componentes en la mezcla. El empleo de PCR-DGGE se ha aplicado
10 a numerosas y complejas comunidades microbiológicas [Muyzer, G., Smalla, K. (1998) Antonie Van Leeuwenhoek 73:127–141; Zoetendal, E. G., Collier, C. T., Koike, S., Mackie, R. I., Gaskins, H. R. (2004) J. Nutr. 134:465–472], mientras que se ha incorporado sólo recientemente en el estudio de comunidades microbiológicas presentes en alimentos fermentados [Ercolini, D. (2004) J.
15 Microbiol. Meth. 56:297–314] y más concretamente en quesos [Randazzo, C.L., Torriani, S., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M., Vaughan, E.E. (2002) Appl. Environ. Microbiol. 68:1882–1892].

El objeto de la presente invención consiste en la aplicación de un procedimiento de detección e identificación rápida y específica de diferentes
20 especies de bacterias lácticas y bifidobacterias presentes en poblaciones mixtas en leches fermentadas y en cultivos iniciadores para leches fermentadas, basado en el diseño de cebadores inéditos y específicos de especie para la amplificación por PCR de secuencias identificadas en regiones variables del 16S rRNA de *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L.*
25 *acidophilus* y *L. casei* subsp. *casei* y del gen de la transaldolasa en *B. lactis* y se complementa con la diferenciación de los fragmentos obtenidos mediante separación por DGGE. Las especies objeto del estudio son añadidas habitualmente como cultivos iniciadores en leches fermentadas probióticas comercializadas en España. Las ventajas del procedimiento son la rapidez y el
30 análisis específico y simultaneo de todas las especies presentes en una misma muestra en estudio.

En relación a las patentes internacionales existentes relacionadas con el tema objeto de la presente invención, se destacan: (i) la patente WO9709448 publicada en 1997, solicitada por los inventores Alatossava, T. y Tilsala-Timisjaervi, A. (Finlandia), que se caracteriza por emplear la secuencia de la región espaciadora entre los genes 16S y 23S rRNA para la identificación específica de lactobacilos y *S. thermophilus*; (ii) las patentes JP11151097 y JP11123093, publicadas en 1999 y solicitadas por la empresa Yakult Honska KK, que se caracterizan por la descripción de oligonucleótidos utilizables para la identificación genérica de bacterias lácticas y bifidobacterias, respectivamente; y (iii) la patente WO2005103294 publicada en 2005, solicitada por los inventores Park, Y.-H., Bae, J.-W., Rhee, S.-K., Park, J. R., Kim, B.-C. (Corea) que se caracteriza por emplear la tecnología de “microarrays” para la detección e identificación de bacterias lácticas, bifidobacterias y propionibacterias. No obstante, no existe ningún procedimiento patentado para la detección e identificación de bacterias lácticas y bifidobacterias en cultivos mixtos en leches fermentadas empleando la tecnología PCR-DGGE.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN:

- Breve descripción de la invención

Se ha desarrollado un procedimiento que permite la rápida detección e identificación de diferentes especies de bacterias lácticas (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. acidophilus*) en cultivos mixtos con *B. lactis*, especies habitualmente presentes en yogur y leches fermentadas que contienen probióticos. El procedimiento emplea secuencias de ADN específicas (cebadores) diseñadas a partir del gen 16S rRNA para las especies de bacterias lácticas y del gen de la transaldolasa para bifidobacterias y que se utilizan para la identificación del ADN procedente de las mencionadas especies mediante amplificación específica por PCR. El procedimiento de identificación se complementa con la separación de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente desnaturizante (DGGE).

- Descripción detallada de la invención

El procedimiento de detección e identificación de diferentes especies de bacterias lácticas (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. acidophilus*) y de *B. lactis* presentes en cultivos mixtos en leches fermentadas se caracteriza por el empleo de cebadores específicos diseñados a partir de secuencias presentes en regiones variables del gen 16S rRNA para las especies de bacterias lácticas y del gen de la transaldolasa para bifidobacterias y que el método que emplea es la amplificación específica mediante PCR. La semejanza en la longitud de los fragmentos amplificados no permite una diferenciación de los productos de PCR en geles convencionales de agarosa, por lo que en la presente invención la aplicación del procedimiento en la identificación simultánea de las especies cuando se encuentran en cultivos mixtos se completa mediante la separación de los productos amplificados en geles de poliacrilamida con gradiente desnaturizante (DGGE).

Los cebadores seleccionados se derivan de la secuencia nucleotídica presente en las regiones variables V1 y V2 identificadas en el gen 16S rRNA para cada una de las especies de bacterias lácticas en estudio; para ello se ha obtenido mediante secuenciación automatizada la secuencia nucleotídica completa de dicho gen a partir de una cepa representativa de cada una de las especies. La secuencia del gen de la transaldolasa se ha obtenido a partir de trabajos anteriores [Requena, T., Burton, J., Matsuki, T., Munro, K., Simon, M.A., Tanaka, R., Tannock, G.W. (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2420–2427]. Los cebadores seleccionados se caracterizan porque cada pareja específica de oligonucleótidos diseñados, o de los derivados de la cadena complementaria, solamente generan un producto de amplificación a partir del ADN genómico procedente de la especie para la que fueron diseñados (Fig. 1). La secuencia objeto de la amplificación con los cebadores específicos puede estar representada también por ARN, dependiendo del método de preparación de la muestra. Las parejas de cebadores para cada una de las especies objeto de la invención se describen a continuación:

- *S. thermophilus*: Se utilizan los cebadores específicos Thermfor; SEQ ID N01 y Thermrev; SEQ ID N02 que generan un producto de PCR de 157 pb.
- 5 • *L. bulgaricus*: Se utilizan los cebadores específicos Bulgfor; SEQ ID N03 y Bulgrev; SEQ ID N04 que generan un producto de PCR de 232 pb.
- *L. acidophilus*: Se utilizan los cebadores específicos Acidfor; SEQ ID N05 y Acidrev; SEQ ID N06 que generan un producto de PCR de 227 pb.
- 10 • *L. casei*: Se utilizan los cebadores específicos Casfor; SEQ ID N07 y Casrev; SEQ ID N08 que generan un producto de PCR de 142 pb.
- *B. lactis*: Se utilizan los cebadores específicos Forlac; SEQ ID N09 y Revlac; SEQ ID N010 que generan un producto de PCR de 116 pb.

15 Cuando los productos de PCR se van a separar mediante DGGE, se añade a uno de los cebadores la abrazadera GC, es decir, una extensión de nucleótidos en posición 5' constituida por la secuencia SEQ ID N011. La selección del cebador óptimo para contener la abrazadera GC se realiza experimentalmente a partir de cada una de las especies con el objeto de obtener una escalera de
20 productos amplificados perfectamente separados, de manera que mezclados constituyan un estándar de productos específicos ("ladder") de referencia para la identificación de las especies en las muestras problema (Fig. 2).

La principal aplicación industrial del procedimiento desarrollado es la detección
25 e identificación de diferentes especies de bacterias lácticas y bifidobacterias en yogures y leches fermentadas que contienen cultivos mixtos de estas bacterias, con el objeto de determinar la autenticidad de la composición microbiológica mostrada en el etiquetado del producto. El procedimiento descrito tiene aplicación tanto en investigación como en el desarrollo industrial de productos y
30 en el control de calidad de los mismos.

Descripción del contenido de las figuras.

La Fig. 1 Productos PCR: muestra un electroforegrama de un gel de agarosa al 2% con los productos de PCR obtenidos por amplificación de ADN de *S. thermophilus* y de dos colonias cuantificadas como pertenecientes a esta especie (carriles 2, 3 y 4). De forma similar se muestran los productos equivalentes a partir de ADN y colonias de *L. bulgaricus* (carriles 5, 6 y 7), *L. acidophilus* (carriles 8, 9 y 10), *L. casei* (carriles 12,13 y 14) y *B. lactis* (carriles 15, 16 y 17). Los carriles 1, 11 y 18, son estándares de tamaño molecular de fragmentos de ADN.

10

La Fig. 2 Separación DGGE mezcla productos PCR: muestra un electroforegrama de un gel de poliacrilamida al 9% con un gradiente entre 40 y 60% de urea 7 M y formamida al 40% con la mezcla de los productos de PCR específicos obtenidos del ADN puro de cada especie ("ladder"; carriles 1 y 7) y de los obtenidos a partir del ADN total extraído de leches fermentadas empleando los cebadores específicos para *S. thermophilus* (carril 2), *L. bulgaricus* (carril 3), *L. casei* (carril 4), *L. acidophilus* (carril 5) y *B. lactis* (carril 6).

20 EJEMPLO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION:

Ejemplo 1: Identificación de colonias de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei* y *B. lactis* obtenidas en medios diferenciales y selectivos para el recuento de estas especies presentes en leches fermentadas.

25 El procedimiento para la identificación de las cinco especies mencionadas se aplicó para confirmar la enumeración realizada en medios selectivos y diferenciales a partir de muestras de leche fermentada comercial que indicaba en la etiqueta que contenía dichas especies. La comprobación de la conformidad de los recuentos se realizó en un 10% de las colonias crecidas en
30 los diferentes medios diferenciales o selectivos que se describen en la Patente de invención Procedimiento para diferenciar y cuantificar bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas que emplea medios de cultivo selectivos libres de antibióticos Para ello se utilizaron los cebadores

descritos en la Tabla 1 y diseñados a partir del procedimiento descrito en la presente invención.

Tabla 1. Parejas de cebadores empleados para la identificación de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei* y *B. lactis*.

Especie	Nombre	Secuencia nucleotídica 5'→3'	Producto
<i>S. thermophilus</i>	Thermfor SEQ ID NO1	ACGCTGAAGAGAGGAGCTTG	157(pb)
	Thermrev SEQ ID NO2	GCAATTGCCCTTTCAAATA	
<i>L. bulgaricus</i>	Bulgfor SEQ ID NO3	TCAAAGATTCCTTCGGGATG	232(pb)
	Bulgrev SEQ ID NO4	TACGCATCATTGCCTTGGTA	
<i>L. acidophilus</i>	Acidfor SEQ ID NO5	AGCGAGCTGAACCAACAGAT	227(pb)
	Acidrev SEQ ID NO6	AGGCCGTTACCCTACCAACT	
<i>L. casei</i>	Casfor SEQ ID NO7	GCACCGAGATTCAACATGGAA	142(pb)
	Casrev SEQ ID NO8	GCCATCTTTCAGCCAAGAACC	
<i>B. lactis</i>	Forlac SEQ ID NO9	GCGCTGGGCTGCTCTGGAAGC	116(pb)
	Revlac SEQ ID NO10	TGGCGACGAGCTCATCGACATACT	

Las colonias en estudio crecidas en los medios diferenciales y selectivos se suspendieron en 20 μ L de agua milliQ estéril y se calentaron a 100 °C durante 5 min; a continuación, la suspensión celular se congeló a -20 °C durante 24 h. Para la PCR se emplearon 2 μ L de la suspensión descongelada y se mezclaron con la pareja de cebadores correspondiente a la especie objeto de identificación (Tabla 1), a la concentración final en la reacción de 0,4 μ M para cada cebador. A la reacción se añadieron los componentes estándar: dNTP

(200 μ M), $MgCl_2$ (1,5 mM) y el tampón específico para la reacción con TaqPolimerasa (Roche). La PCR es común para todas las parejas de cebadores: 35 ciclos con temperatura de desnaturalización a 94 °C, hibridación a 60 °C y elongación a 72 °C. Previo al primer ciclo de reacción las muestras se incubaron a 94 °C durante 3 minutos y después de finalizar el último ciclo se prolongó 5 minutos la elongación de fragmentos a 72 °C, seguido de refrigeración a 4 °C. Los productos de la reacción (5 μ L) se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% para lo que previamente se centrifugaron las muestras a 10.000 rpm durante 3 minutos con el objeto de sedimentar los restos celulares presentes en la reacción.

La identificación de las colonias se realizó mediante comparación de los productos amplificados procedentes de las colonias problema con los del ADN procedente de cada una de las especies puras (Fig. 1). La separación obtenida no es suficiente en el caso de contar con cultivos mixtos en los que no se tengan identificadas previamente las cepas.

Ejemplo 2: Detección e identificación mediante PCR-DGGE de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei* y *B. lactis* presentes en cultivos mixtos en leches fermentadas.

El procedimiento descrito en la presente invención también puede emplearse para la detección e identificación específica de bacterias lácticas y bifidobacterias sin necesidad de realizar la separación previa de las especies mediante cultivo selectivo o diferencial. La detección e identificación de las cinco especies se aplicó en el análisis de muestras de leche fermentada comercial que indicaba en la etiqueta que contenía dichas especies.

La obtención del ADN total de las muestras (mezcla de ADN procedente de todas las especies) se realizó a partir de 3 ml de leche fermentada, que se neutralizó a pH 6 con NaOH 1M, a los que se añadieron 10 ml de EDTA al 0,2%, pH 12, para dispersar las caseínas. Las células se sedimentaron mediante centrifugación durante 15 minutos a 6.000 rpm. Para la extracción de ADN, las células se rompieron con bolas de vidrio (diámetro de 150-212 μ m) y el ADN se precipitó con isopropanol, previa eliminación de restos de material

celular con acetato amónico 10 M y una mezcla 24:1 de cloroformo:alcohol isoamílico. El ADN total se purificó finalmente mediante precipitación con etanol y se resuspendió en tampón Tris-HCl 10 M, pH 8, y EDTA 1 M.

5 Para la PCR se utilizaron 500 ng de ADN total y se siguieron las condiciones de reacción descritas en el Ejemplo 1, empleando los cebadores que se muestran en la Tabla 1, pero con la diferencia de que se añadió la abrazadera GC en los cebadores SEQ ID NO1,4,5,7,10 ThermforGC, BulgrevGC, AcidforGC, CasforGC y RevlacGC.

10 Los productos de PCR obtenidos se añadieron (1 μ L) a un gel de poliacrilamida al 9% con un gradiente entre 40 y 60% de urea 7 M y formamida al 40% y se separaron mediante electroforesis a 130 V durante 4,5 horas.

15 Para la detección e identificación de las cinco especies que se mencionan en la invención se preparó un estándar de productos específicos ("ladder") obtenido de la mezcla de 0,5 μ L de cada uno de los fragmentos procedentes de la amplificación del ADN puro de cada especie (Fig. 2, carriles 1 y 7). La amplificación del ADN total obtenido de las leches fermentadas con las parejas de cebadores específicos permite la detección e identificación de las especies de bacterias lácticas y bifidobacterias presentes en la muestra (Fig. 2, carriles 2 a 6).

20

REIVINDICACIONES:

- 5 1. Procedimiento para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas caracterizado por el uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa mediante una única reacción con cebadores que comprenden oligonucleótidos específicos de regiones variables del gen 16S rRNA para las bacterias lácticas y del gen de la transaldolasa para bifidobacterias.
- 10 2. Procedimiento para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas según la reivindicación 1, caracterizado porque se realiza la detección e identificación de diferentes especies de bacterias lácticas (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. acidophilus*) en cultivos mixtos con *B. lactis*, especies habitualmente presentes en yogur y leches fermentadas que contienen probióticos en mezcla de las cinco especies o en las diferentes combinaciones binarias, ternarias o cuaternarias obtenidas a partir de las cinco especies.
- 15 3. Procedimiento para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas según las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque los cebadores seleccionados para las bacterias lácticas se derivan de la secuencia nucleotídica presente entre las regiones variables V1 y V2 del gen 16S rRNA y los cebadores seleccionados para *B. lactis* se derivan de regiones variables presentes en la secuencia nucleotídica del gen de la transaldolasa.
- 20 4. Procedimiento para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por utilizar la pareja de
- 25
- 30

- oligonucleótidos específicos de *S. thermophilus*, SEQ ID N01 y SEQ ID N02 que generan un producto de PCR de 157 pb.
5. Procedimiento para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por utilizar la pareja de oligonucleótidos específicos de *L. bulgaricus*, SEQ ID N03 y SEQ ID N04 que generan un producto de PCR de 232 pb.
6. Procedimiento para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por utilizar la pareja de oligonucleótidos específicos de *L. acidophilus*, SEQ ID N05 y SEQ ID N06 que generan un producto de PCR de 227 pb.
7. Procedimiento para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por utilizar la pareja de oligonucleótidos específicos de *L. casei*, SEQ ID N07 y SEQ ID N08 que generan un producto de PCR de 142 pb.
8. Procedimiento para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas según las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por utilizar la pareja de oligonucleótidos específicos de *B. lactis*, SEQ ID N09 y SEQ ID N010 que generan un producto de PCR de 116 pb.
9. Procedimiento para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas según las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la identificación mediante amplificación específica por PCR se complementa con la separación de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente

desnaturalizante (DGGE) para lo que en la reacción de PCR se añade a uno de los cebadores la abrazadera GC, es decir, una extensión de nucleótidos en posición 5' constituida por la secuencia SEQ ID N011.

- 5 10. Procedimiento para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas según la reivindicación 9, caracterizado porque la identificación de *S. thermophilus*, se hace añadiendo a SEQ ID N01 una extensión de
- 10 nucleótidos en posición 5' constituida por la secuencia SEQ ID N011.
11. Procedimiento para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas según la
- 15 reivindicación 9, caracterizado porque la identificación de *L. bulgaricus*, se hace añadiendo a SEQ ID N04 una extensión de nucleótidos en posición 5' constituida por la secuencia SEQ ID N011.
12. Procedimiento para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches
- 20 fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas según la reivindicación 9, caracterizado porque la identificación de *L. acidophilus*, se hace añadiendo a SEQ ID N05 una extensión de nucleótidos en posición 5' constituida por la secuencia SEQ ID
- 25 N011.
13. Procedimiento para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas según la
- 30 reivindicación 9, caracterizado porque la identificación de *L. casei*, se hace añadiendo a SEQ ID N07 una extensión de nucleótidos en posición 5' constituida por la secuencia SEQ ID N011.
14. Procedimiento para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches

fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas según la reivindicación 9, caracterizado porque la identificación de *B. lacti*, se hace añadiendo a SEQ ID N010 una extensión de nucleótidos en posición 5' constituida por la secuencia SEQ ID N011.

5 15. Procedimiento para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas según las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la amplificación de los
10 fragmentos de doble cadena se realiza con las parejas de oligonucleótidos cebadores indicados en las reivindicaciones 1 a 8 correspondientes a las cinco especies, a partir de una suspensión de las colonias, calentada a 100 °C y congelada a -20 °C y bajo las siguientes condiciones preferentes:

✓ un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos.

15 ✓ 35 ciclos:

- Desnaturalización a 94°C (30 segundos)
- Anillamiento a 60°C
- Extensión a 72°C

✓ Incubación a 72 °C durante 5 minutos seguidos de
20 refrigeración a 4°C y los productos de la PCR centrifugados se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa.

25 16. Procedimiento para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas según las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la amplificación de los fragmentos de doble cadena se realiza con las parejas de oligonucleótidos cebadores indicados en las reivindicaciones 1 a 8 correspondientes a las cinco especies, a partir de ADN total y bajo las siguientes condiciones preferentes:

30 ✓ un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos.

✓ 35 ciclos:

- Desnaturalización a 94°C (30 segundos)
- Anillamiento a 60°C

- Extensión a 72°C
- ✓ Incubación a 72 °C durante 5 minutos seguidos de refrigeración a 4°C y los productos de la PCR se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa.
- 5 17. Procedimiento para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas según las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque la amplificación de los fragmentos de doble cadena se realiza con las parejas de oligonucleótidos cebadores indicados en las reivindicaciones 9 a 10 14 correspondientes a las cinco especies, a partir de ADN total y bajo las siguientes condiciones preferentes:
- ✓ un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos.
 - ✓ 35 ciclos:
- 15 • Desnaturalización a 94°C (30 segundos)
 - Anillamiento a 60°C
 - Extensión a 72°C
- ✓ Incubación a 72 °C durante 5 minutos seguidos de refrigeración a 4°C y 1 µL de los productos de PCR se separan en un gel de poliacrilamida al 9% con un gradiente entre 40 y 20 60% de urea 7 M y formamida al 40%.
18. Procedimiento para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas según las 25 reivindicaciones 15 y 16, caracterizado porque utiliza como material de partida colonias y cultivos de las especies bacterianas, respectivamente.
19. Procedimiento para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas según la 30 reivindicación 17, caracterizado porque utiliza como material de partida leches fermentadas, yogures, derivados lácteos o alimentos que los contengan o los utilicen como ingredientes.

- 5 20. Pareja de oligonucleótidos cebadores específicos de *S. thermophilus*, SEQ ID N01 y SEQ ID N02 que generan un producto de PCR de 157 pb que permite la detección e identificación simultánea de esta bacteria láctica en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas por PCR según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 15 y 16.
- 10 21. Pareja de oligonucleótidos cebadores específicos de *L. bulgaricus*, SEQ ID N03 y SEQ ID N04 que generan un producto de PCR de 232 pb que permite la detección e identificación simultánea de esta bacteria láctica en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas por PCR según las reivindicaciones 1, 2, 3, 5, 15 y 16.
- 15 22. Pareja de oligonucleótidos cebadores específicos de *L. acidophilus*, SEQ ID N05 y SEQ ID N06 que generan un producto de PCR de 227 pb que permite la detección e identificación simultánea de esta bacteria láctica en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas por PCR según las reivindicaciones 1, 2, 3, 6, 15 y 16.
- 20 23. Pareja de oligonucleótidos cebadores específicos de *L. casei*, SEQ ID N07 y SEQ ID N08 que generan un producto de PCR de 142 pb que permite la detección e identificación simultánea de esta bacteria láctica en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas por PCR según las reivindicaciones 1, 2, 3, 7, 15 y 16.
- 25 24. Pareja de oligonucleótidos cebadores específicos de *B. lactis*, SEQ ID N09 y SEQ ID N010 que generan un producto de PCR de 116 pb que permite la detección e identificación simultánea de esta bacteria en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas por PCR según las reivindicaciones 1, 2, 3, 8, 15 y 16.
- 30 25. Pareja de oligonucleótidos cebadores específicos de *S. thermophilus*, SEQ ID N01 con una extensión de nucleótidos en posición 5' constituida por la secuencia SEQ ID N011 y SEQ ID N02 que generan un producto de PCR de 197 pb que permite la detección e identificación simultánea de esta bacteria láctica en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas por PCR según las reivindicaciones 1, 2, 3, 9, 10 y 17.

- 5 26. Pareja de oligonucleótidos cebadores específicos de *L. bulgaricus*, SEQ ID N03 y SEQ ID N04 con una extensión de nucleótidos en posición 5' constituida por la secuencia SEQ ID N011 que generan un producto de PCR de 272 pb que permite la detección e identificación simultánea de esta bacteria láctica en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas por PCR según las reivindicaciones 1, 2, 3, 9, 11 y 17.
- 10 27. Pareja de oligonucleótidos cebadores específicos de *L. acidophilus*, SEQ ID N05 con una extensión de nucleótidos en posición 5' constituida por la secuencia SEQ ID N011 y SEQ ID N06 que generan un producto de PCR de 267 pb que permite la detección e identificación simultánea de esta bacteria láctica en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas por PCR según las reivindicaciones 1, 2, 3, 9, 12 y 17.
- 15 28. Pareja de oligonucleótidos cebadores específicos de *L. casei*, SEQ ID N07 con una extensión de nucleótidos en posición 5' constituida por la secuencia SEQ ID N011 y SEQ ID N08 que generan un producto de PCR de 182 pb que permite la detección e identificación simultánea de esta bacteria láctica en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas por PCR según las reivindicaciones 1, 2, 3, 9, 13 y 17
- 20 29. Pareja de oligonucleótidos cebadores específicos de *B. lactis*, SEQ ID N09 y SEQ ID N010 con una extensión de nucleótidos en posición 5' constituida por la secuencia SEQ ID N011 que generan un producto de PCR de 156 pb que permite la detección e identificación simultánea de esta bacteria en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas por PCR según las reivindicaciones 1, 2, 3, 9, 14 y 17.
- 25 30. Kit de diagnóstico por PCR para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y cultivos iniciadores de leches fermentadas caracterizado por amplificar un fragmento del gen 16S rRNA para las bacterias lácticas y del gen de la transaldolasa para
- 30

18

bifidobacterias según los procedimientos descritos en las reivindicaciones 1 a 17 y por emplear los cebadores descritos en las reivindicaciones 18 a 29.

5

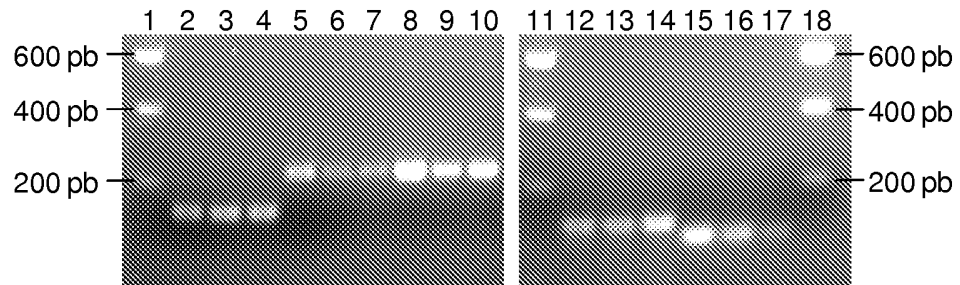


Fig. 1

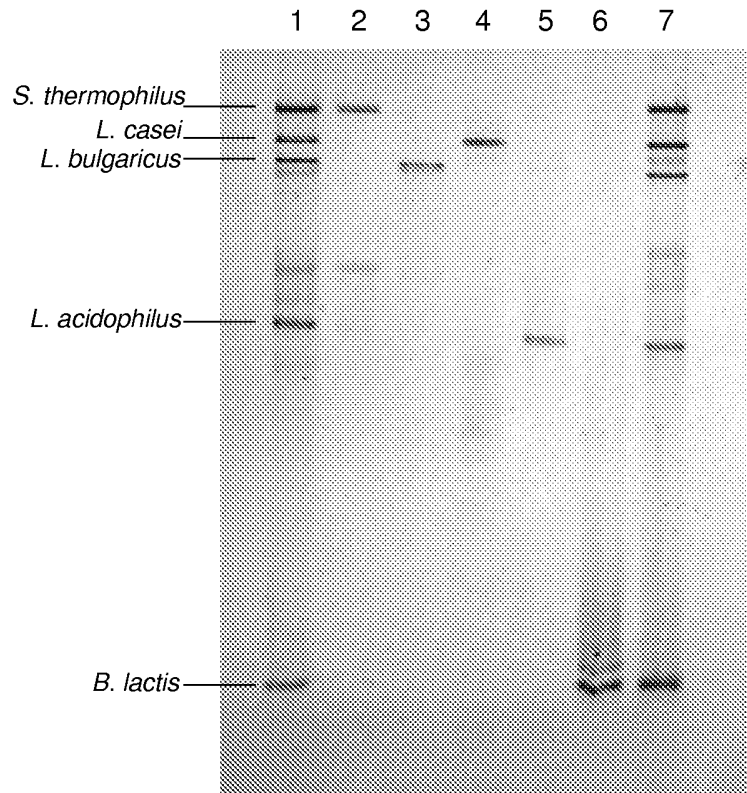


Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2007/070124

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)

C12P,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.
Y	RANDAZZO C. et al. Diversity, dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. Applied and Environmental Microbiology. April 2002, Vol.68, N° 4, pages 1882-1892. ISSN 0099-2240	1-3
Y	REQUENA T. et al. Identification, detection and enumeration of human Bifidobacterium species by PCR targeting the Transaldolase Gene. Applied and Environmental Microbiology. May 2002, Vol. 68, N° 5, pages 2420-2427. ISSN 0099-2240	1-3
X	SATOKARI R. M. et al. Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract Systematic and Applied Microbiology. 2003, Vol. 26, pages 572-584. ISSN 0723-2020	6, 7, 9, 22, 23

 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

21 November 2007 (21.11.2007)

Date of mailing of the international search report

(22/11/2007)

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

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.: **Claims 10, 11, 12, 13, 14, 17, 19, 25, 26, 27, 28 and 29, and 9 and 30 (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:
The subject matter of the above claims fails to meet the requirements of clarity and conciseness (PCT Article 6) to such an extent that it is not possible to carry out a meaningful search in respect of said claims, because they refer to a sequence listing (SEQ ID No. 11) that is not included in the list of sequences submitted to this Authority for the purposes of the search.
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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2007/070124

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. 2004, Vol. 37, pages 839-850. ISSN 0963-9969	6, 7, 9, 22, 23

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 19/34 (2006.01)

C12R 1/46 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

C12R 1/23 (2006.01)

C12R 1/245 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 2007/070124

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)
C12P,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
Y	RANDAZZO C. et al. Diversity, dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. Applied and Environmental Microbiology. Abril 2002, Vol.68, Nº 4, páginas 1882-1892. ISSN 0099-2240	1-3
Y	REQUENA T. et al. Identification, detection and enumeration of human Bifidobacterium species by PCR targeting the Transaldolase Gene. Applied and Environmental Microbiology. Mayo 2002, Vol. 68, Nº 5, páginas 2420-2427. ISSN 0099-2240	1-3
X	SATOKARI R. M. et al. Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract Systematic and Applied Microbiology. 2003, Vol. 26, páginas 572-584. ISSN 0723-2020	6, 7, 9, 22, 23

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.

21 Noviembre 2007 (21.11.2007)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

22 de noviembre de 2007 (22/11/2007)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Funcionario autorizado

M. Cumbreño Galindo

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Nº de teléfono +34 91 349 96880

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2007/070124

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}: 10, 11, 12, 13, 14, 17, 19, 25, 26, 27, 28 y 29, y 9 y 30 (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:
El objeto de las reivindicaciones 10, 11, 12, 13, 14, 17, 19, 25, 26, 27, 28 y 29, y 9 y 30 (parcialmente) no alcanza a cumplir los requisitos de claridad y concisión del Artículo 6 del PCT hasta tal extremo que una búsqueda significativa, basada en esas reivindicaciones, resulta imposible, ya que se hace referencia a una secuencia SEQ ID N011 que no aparece en la lista de secuencias presentada ante esta Administración a los fines de búsqueda.

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:

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.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 2007/070124

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 Lactobacillus and Bifidobacterium populations included in commercial fermented milks. Food Research International. 2004, Vol. 37, páginas 839-850. ISSN 0963-9969	6, 7, 9, 22, 23

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12P 19/34 (2006.01)

C12R 1/46 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

C12R 1/23 (2006.01)

C12R 1/245 (2006.01)