



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 322 827**

⑫ Número de solicitud: 200601788

⑬ Int. Cl.:
C12P 19/34 (2006.01)
C12R 1/46 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **03.07.2006**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **29.06.2009**

Fecha de la concesión: **12.04.2010**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **23.04.2010**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
23.04.2010

⑲ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑳ Inventor/es: **Tabasco Rentero, Raquel;
Paarup, Torsten;
Janer Otero, Carolina;
Peláez Martínez, Carmen y
Requena Rolanía, Teresa**

㉑ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉒ 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.**

㉓ 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 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.

ES 2 322 827 B1

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias en leches fermentadas y en cultivos iniciadores para leches fermentadas.

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.

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 bifidus” 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].

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., 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., Margolies, 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 replazo 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 separación de los fragmentos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente desnaturante (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 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. 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 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. 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 análisis específico y simultáneo 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 W09709448 publicada en 1997, solicitada por los inventores Alatosava, 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 W02005103294 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 desnaturalizante (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 desnaturalizante (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.
- *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.
- *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.

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 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 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 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.

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).

Ejemplo de realización de la invención

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

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 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 pasa a página siguiente)

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	GCAATTGCCCCCTTTCAAATA	
<i>L. bulgaricus</i>	Bulgfor SEQ ID NO3	TCAAAGATTCTTCGGGATG	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), MgCl₂ (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.

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 N01,4,5,7,10 ThermforGC, BulgrevGC, AcidforGC, CasforGC y RevlacGC.

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.

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).

REIVINDICACIONES

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.

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.

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.

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 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 desnaturizante (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.

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 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 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 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 N011.

ES 2 322 827 B1

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 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.

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 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.
- ✓ 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 centrifugados se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa.

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:

- ✓ 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.

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 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:
 - 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 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 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 reivindicación 17, **caracterizado** porque utiliza como material de partida leches fermentadas, yogures, derivados lácteos o alimentos que los contengan o los utilicen como ingredientes.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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

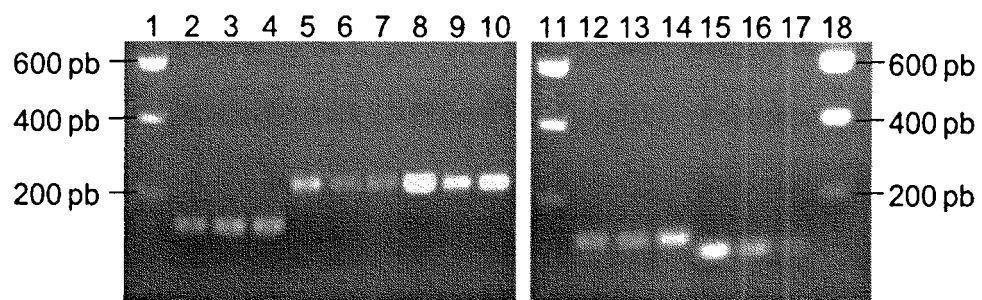


Fig. 1

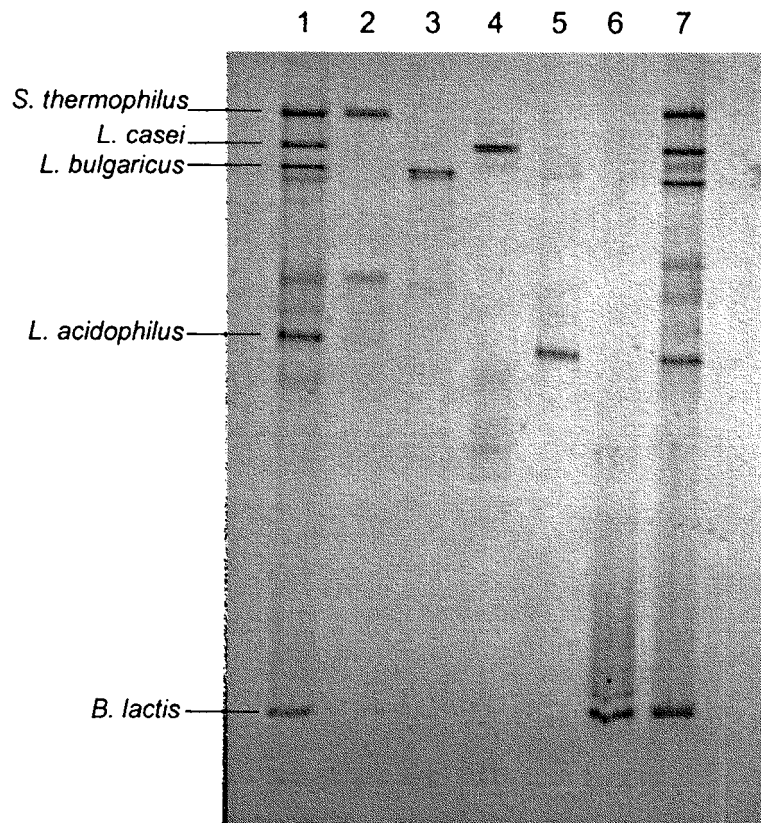


Fig. 2

ES 2 322 827 B1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Tabasco Rentero, Raquel
5 Paarup, Torsten
Janer Otero, Carolina
Peláez Martínez, Carmen
Requena Rolanía, Teresa
- 10 <120> Procedimiento para la detección e identificación simultánea y específica de bacterias lácticas y bifidobacterias
en leches fermentadas y en cultivos iniciadores para leches fermentadas.
- <130> PCRLACBIF
- 15 <160> 10
- <170> PatentIn versión 3.3
- 20 <210> 1
<211> 20
<212> DNA
- 25 <213> *Streptococcus thermophilus*
- <400> 1
- 30 acgctgaaga gaggagcttg 20
- <210> 2
<211> 20
- 35 <212> DNA
<213> *Streptococcus thermophilus*
- <400> 2
- 40 gcaattgccc ctttcaaata 20
- <210> 3
<211> 20
<212> DNA
- 45 <213> *Lactobacillus bulgaricus*
- <400> 3
- 50 tcaaagattc cttcgggatg 20
- <210> 4
<211> 20
<212> DNA
- 55 <213> *Lactobacillus bulgaricus*
- 60 <400> 4
- 65 tacgcatcat tgccttgta 20
- <210> 5
<211> 20

ES 2 322 827 B1

	<212> DNA	
	<213> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	
5	<400> 5	
	agcgagctga accaacagat	20
10	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	
15	<400> 6	
	aggccgttac cctaccaact	20
20	<210> 7	
	<211> 21	
	<212> DNA	
25	<213> <i>Lactobacillus casei</i>	
	<400> 7	
30	gcaccgagat tcaacatgga a	21
	<210> 8	
	<211> 21	
35	<212> DNA	
	<213> <i>Lactobacillus casei</i>	
	<400> 8	
40	gccatctttc agccaagaac c	21
	<210> 9	
45	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> <i>Bifidobacterium lactis</i>	
50	<400> 9	
	gcgctgggct gctctggaag c	21
55	<210> 10	
	<211> 24	
	<212> DNA	
60	<213> <i>Bifidobacterium lactis</i>	
	<400> 10	
65	tggcgacgag ctcacgaca tact	24



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 322 827

⑫ Nº de solicitud: 200601788

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 03.07.2006

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
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
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
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.	4,5,7(en parte), 13, 14, 18, 19, 21(en parte)
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.	1-21

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

02.06.2009

Examinador

M. Cumbreño Galindo

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12P 19/34 (2006.01)

C12R 1/46 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)