



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 315 038**

② Número de solicitud: 200402176

⑤ Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **11.09.2004**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2009**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.03.2009

⑰ Solicitante/s:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad del País Vasco y
Universidad de Cantabria**

⑱ Inventor/es: **López García, Paloma;
Werning, María Laura;
Iraistorza Iribas, Ana;
Dueñas Chasco, María Teresa;
Ibarburu López, Idoia y
Navas Méndez, Jesús**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Procedimiento de detección molecular de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos.**

㉑ Resumen:

Procedimiento de detección molecular de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos.

Esta invención presenta un nuevo método de detección e identificación rápida de bacterias ácido lácticas productoras de exopolisacáridos por amplificación de su gen *gtf* codificante de una glicosil transferasa. La utilización de este método podría permitir la prevención del ahilamiento de bebidas alcohólicas y el aislamiento de nuevas estirpes que podrían ser utilizadas para la producción de alimentos fermentados.

ES 2 315 038 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de detección molecular de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos.

5 **Sector de la técnica**

Biotechnología. Métodos de detección de bacterias productoras de exopolisacáridos con aplicación en la industria alimentaria y cosmética.

10 **Estado de la técnica**

Las bacterias ácido lácticas (LAB) son capaces de producir polímeros de azúcares de alto peso molecular que son excretados al medio y que se conocen como exopolisacáridos o EPS. Algunos de estos polímeros son utilizados en la industria alimenticia como agentes estabilizadores, viscosificadores, gelificadores y emulsivos. Entre las LAB productoras de EPSs están incluidas algunas estirpes pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*, que están siendo utilizadas *in situ* para mejorar la textura de productos fermentados como el yogourt y el queso (de Vos (1999) Curr. Opin. Biotech. 10:483). Por otra parte, se han realizado estudios que indican que los EPS producidos por las LAB poseen efectos beneficiosos para la salud humana como estimuladores del sistema inmunitario y por ello se ha propuesto la utilización de las estirpes productoras para obtener alimentos funcionales (Jolly y cols. (2002) Antonie van Leeuwenhoek 82: 367-374). Además, algunos de los EPSs son β -glucanos y existen evidencias de que estos homopolisacáridos contribuyen a disminuir los niveles de colesterol sérico (Behall y cols. (1997) J. Am. College Nutr. 16:64-51. De ahí el interés de obtener bacterias productoras de β -glucanos que puedan ser utilizadas para la elaboración de alimentos y preparados dietéticos.

Por otra parte, los EPSs producidos por LAB tienen efectos deletereos en las bebidas alcohólicas ya que provocan alteraciones de su textura. Esta alteración consiste en la producción de exopolisacáridos (EPS) por algunas estirpes de LAB pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* (Beech y cols. (1977) Academic Press London 139). En concreto, durante la producción de sidra, frecuentemente se detectan defectos organolépticos en la bebida alcohólica: "sidras ahiladas" muy viscosas y de aspecto aceitoso generadas por una producción excesiva de EPSs, durante la fermentación del mosto de manzana. Esta alteración observada en la sidra, también tiene lugar durante la elaboración de vinos y cervezas. Actualmente no se utilizan métodos de detección directa de estirpes productoras de EPSs, antes de que se produzca la alteración de las bebidas alcohólicas. Para resolver este problema, la práctica tradicional es desechar directamente las bebidas ahiladas o antes de proceder a su eliminación esperar a que el carácter revierta, situación que ocurre en algunos casos.

Con el doble objetivo de minimizar la producción de bebidas ahiladas e identificar bacterias productoras de EPS de utilidad como adyuvantes en la producción de alimentos fermentados, se ha procedido a aislar y caracterizar estirpes de LAB productoras de EPS de bebidas alteradas. Estirpes de *Pediococcus damnosus* productoras de EPSs han sido aisladas de vinos (Lonvaud-Funel y cols. (1993) J. Appl. Bacteriol. 74:41-47) y sidras (Fernández y cols. (1996) Journal of Food Protection, 59, 35-40) ahiladas. El estudio de dichas estirpes ha revelado, que las bacterias aisladas de vino o sidra poseen respectivamente un plásmido de 5,5 kb (Gindreau y cols. (2001) J. Appl. Microbiol. 90:535-542) y un plásmido de 35 kb (Fernández y cols. (1996) Journal of Food Protection, 59, 35-40) y que la eliminación de dichos plásmidos conlleva la pérdida de la capacidad bacteriana de producción de EPSs.

La secuenciación del plásmido de 5,5 kb reveló la existencia de un gen *mob* con capacidad para codificar una proteína homóloga a las proteínas implicadas en transferencia conjugativa por movilización. Utilizando esta secuencia se ha desarrollado y descrito un procedimiento molecular para la detección por reacción de polimerización en cadena (PCR) de cepas de *P. damnosus* productoras de EPS (Gindreau y cols. (2001) J. Appl. Microbiol. 90: 535-542).

La caracterización estructural de los EPSs producidos por las estirpes *P. damnosus* 2.6 (Dueñas y cols.(1998) Carbohidr. Res. 303: 453-458) y *Lactobacillus sp. G77* (Dueñas y cols. (1997) Carbohidr. Res. 307: 125-133) y *Oenococcus oeni* 14 (resultados no publicados) aisladas de sidras ahiladas revelaron que todas ellas sintetizan el mismo β -glucano. Además, se ha demostrado, que tanto *P. damnosus* 2.6 como *Lactobacillus sp. G77* pueden crecer y producir EPS durante la elaboración de alimentos fermentados basados en la avena, mejorando sus cualidades organolépticas (Olof Mårtensson y cols. (2002) Nutrition Research 22: 1461-1473).

En esta patente original se describe el método de detección de estirpes productoras de EPS a partir de DNA purificado, de colonia o directamente en sidra utilizando la técnica de PCR. El método previamente descrito (Gindreau y cols. (2001) J. Appl. Microbiol. 90: 535-542) detecta el plásmido portador del gen *gtf* que es diferente en distintas especies y géneros bacterianos. Sin embargo, esta patente presenta la ventaja sobre el anterior método de detectar específicamente el gen *gtf* y no su plásmido portador, y por tanto permite la detección de estirpes productoras de β -glucano independientemente de la localización génica del gen codificante del enzima implicada en la síntesis de este EPS.

65

Descripción de la invención

Descripción breve

5 Un objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de detección molecular de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos, en adelante procedimiento de la invención, caracterizado por el uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de amplificación de DNA con una pareja de oligonucleótidos cebadores específicos del gen *gtf* (SEQ ID NO 16) de *Pediococcus damnosus* 2.6, entre otros, y a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, la siguiente pareja de oligonucleótidos cebadores constituida por los oligonucleótidos GTF-F (SEQ ID NO 9) y GTF-R (SEQ ID NO 10) y bajo unas condiciones adecuadas de amplificación del fragmento de

- 10 doble cadena flanqueado por dichos oligonucleótidos, como por ejemplo, las siguientes:
- un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos.
 - 15 - 30 ciclos:
 - Desnaturalización a 95°C (1 minuto)
 - Anillamiento a 50°C (1,5 minutos)
 - 20 ▪ Extensión a 72°C (0,5 minutos)
 - Incubación a 72°C durante 10 minutos para permitir la finalización de todas las cadenas iniciadas previamente.

25 Otro objeto de la presente invención lo constituye una pareja de nucleótidos cebadores específicos del gen *gtf* de *P. damnosus* 2.6, en adelante pareja de oligonucleótidos cebadores de la presente invención, que permiten la amplificación específica por PCR del gen *gtf* de distintas especies bacterianas. Un objeto particular de la presente invención lo constituye la siguiente pareja de oligonucleótidos específicos del gen *gtf*, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención:

- 30 -5'-CGGTAATGAAGCGTTTCCTG-3' (Oligo GTF-F, SEQ ID NO 9)
- 35 -5'-GCTAGTACGGTAGACTTG-3' (Oligo GTF-R, SEQ ID NO 10)

Otro objeto de la presente invención lo constituye un kit de detección de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos caracterizado porque contiene una pareja de oligonucleótidos cebadores de la presente invención.

40 Finalmente, otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la pareja de oligonucleótidos cebadores y del procedimiento de la presente invención para la detección de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos de interés industrial que permitan tomar decisiones en el ámbito de calidad alimentaria, preferentemente, y a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, en el sector de los productos lácteos, avena, o de bebidas alcohólicas (vino, sidra, cerveza, etc), tanto para asegurar la caracterización de las cepas que pueden formar parte

45 de un cultivo iniciador como para controlar los procesos de fermentación una vez iniciados y los productos finales como son los alimentos ya elaborados por ejemplo productos lácteos como el queso y el yogurt, entre otros, vinos, sidras, cervezas, etc, y determinar la existencia de trazas previas o presentes de cepas productoras de β -glucanos. Este procedimiento puede permitir un control de la calidad de los alimentos como un ahorro económico a las empresas que pueden desechar determinados procesos de producción a tiempo.

50 Descripción detallada

La presente invención tiene como objeto un procedimiento de detección molecular de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos y de producción de β -glucanos.

55 Los inventores de la presente invención han identificado un gen codificante de una enzima con actividad glicosiltransferasa, *gtf*, a partir de material genómico de *Pediococcus damnosus* 2.6 (ver solicitud de patente española "Secuencias, vectores y células *gtf* y sus aplicaciones en el sector alimentario" (2004)). La secuencia de DNA codificante del gen *gtf* se muestra en la SEQ ID NO 16. El gen *gtf* codifica la proteína GTF de 567 aminoácidos que se detallan en la SEQ ID NO 6. La comparación de la secuencia de dicho gen *gtf* con las depositadas en las bases de datos mostró la ausencia de homologías significativas. Sin embargo, al comparar la secuencia de la proteína codificada por el gen *gtf* (GTF) se observó que es homóloga a las glicosiltransferasas de la familia COG1215 (ver Ejemplo 1).

65 Experimentos de hibridación de Southern realizados para determinar la localización genómica del gen *gtf* en *P. damnosus* 2.6 y la presencia del mismo en *Lactobacillus*. *Sp. G77* y *O. oeni* 14, han revelado que el gen se encuentra también en *Lactobacillus* y *Oenococcus* (Figura 1) aunque en plásmidos y localizaciones genómicas distintas.

Por otra parte, y mediante el mismo método y cebadores se ha comprobado que las estirpes productoras de β -glucano, *Lb. sp. G77* y *O. oeni* 14 portan dicho gen flanqueado por distintas regiones adyacentes (Figura 2). La distinta localización genómica del gen *gtf* entre las distintas estirpes de *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Oenococcus* aisladas de la sidra muestran que el método (Gindreau y cols. J. Appl. Microbiol. (2001) 90: 535-542) basado en la detección de regiones adyacentes al gen *gtf* no es capaz de detectar de forma general las estirpes aisladas de sidra productoras de β -glucano (Ejemplo 2) mientras que el procedimiento de la presente invención sí.

Los inventores han encontrado que los genes de *Lb. sp. G77* y *O. oeni* 14 poseen una homología de más del 99% con el gen *gtf* de *P. damnosus* 2.6. Además, los inventores han demostrado que la secuencia de los oligonucleótidos GTF-F y GTF-R aparece conservada en los genes de los tres géneros bacterianos. Esto implica que tales oligonucleótidos pueden ser empleados para amplificar específicamente el gen *gtf*. Con los oligonucleótidos GTF-F y GTF-R y utilizando DNA genómico de las tres bacterias objeto de estudio se obtiene como resultado de la amplificación mediante PCR un único producto de 0.45 kb (Ejemplo 2).

A partir del clonaje y caracterización del gen *gtf* de *P. damnosus* 2.6, que codifica la glicosiltransferasa GTF han sido desarrollados métodos de detección de estirpes productoras de EPSs a partir de colonia o directamente del alimento o bebida en fermentación, por ejemplo, en sidra utilizando la técnica de PCR para la amplificación del gen *gtf*, permitiendo la detección e identificación molecular rápido de LABs productoras de β -glucanos incluyendo *Pediococcus damnosus*, *Lactobacillus sp.* y *Oenococcus oeni*, que codifican una glicosiltransferasa. Este método detecta específicamente el gen *gtf* y por tanto permite la detección de diferentes estirpes productoras de β -glucano.

Tras analizar una colección de 40 LAB, con fenotipos de productor y no productor de exopolisacárido, que consiste en cepas de referencia pertenecientes a distintas especies de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Streptococcus*, así como cepas aisladas de sidras ahiladas, los resultados han mostrado que el método de la presente invención permite la detección específica de estirpes portadoras de *gtf* y que la proteína GTF está implicada específicamente en la biosíntesis de homopolisacáridos constituidos por β -glucano y no otro tipo de homo- o hetero-polisacárido (Ejemplo 4).

El método de extracción de DNA bacteriano directamente de sidra y el posterior análisis del genoma por PCR ha permitido la detección de LAB productoras de EPS en sidra (Figura 3) con un título de 3×10^2 UFC. ml⁻¹, indicando que este método puede ser utilizado para detectar el agente productor de β -glucano antes de que las sidras se alteren.

Así, un objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de detección molecular de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos, en adelante procedimiento de la invención, caracterizado por el uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de amplificación de DNA con una pareja de oligonucleótidos cebadores específicos del gen *gtf* (SEQ ID NO 16) de *Pediococcus damnosus* 2.6, entre otros, y a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, la siguiente pareja de oligonucleótidos cebadores constituida por los oligonucleótidos GTF-F (SEQ ID NO 9) y GTF-R (SEQ ID NO 10) y bajo unas condiciones adecuadas de amplificación del fragmento de doble cadena flanqueado por dichos oligonucleótidos, como por ejemplo, las siguientes:

- un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos.
- 30 ciclos:
 - Desnaturalización a 95°C (1 minuto)
 - Anillamiento a 50°C (1,5 minutos)
 - Extensión a 72°C (0,5 minutos)
- Incubación a 72°C durante 10 minutos para permitir la finalización de todas las cadenas iniciadas previamente.

Hay que señalar que las condiciones de la reacción PCR descritas anteriormente pueden adaptarse fácilmente por un experto medio de la técnica de la presente invención dependiendo del termociclador, pudiéndose modificar las condiciones de desnaturalización, la temperatura de anillamiento, la temperatura de extensión, la polimerasa así como la secuencia de los cebadores, etc, de tal forma que estos procedimientos de amplificación del gen *gtf* por (PCR) forman parte de la presente invención.

Un objeto particular de presente invención es el procedimiento de la invención en el que el DNA a amplificar proviene de distintos materiales de partida como un cultivo de bacterias sin mediar la extracción de DNA, DNA extraído de las bacterias o DNA extraído de un alimento. El cultivo de bacterias puede provenir del propio alimento en fermentación (vino, sidra, avena, etc) o del propio alimento ya elaborado.

Otro objeto de la presente invención lo constituye una pareja de nucleótidos cebadores específicos del gen *gtf* de *P. damnosus* 2.6, en adelante pareja de oligonucleótidos cebadores de la presente invención, que permiten la amplificación específica por PCR del gen *gtf* de distintas especies bacterianas. Un objeto particular de la presente invención lo

constituye la siguiente pareja de oligonucleótidos específicos del gen *gtf*, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención:

5 -5'-CGGTAATGAAGCGTTTCCTG-3' (Oligo GTF-F, SEQ ID NO 9)

-5'-GCTAGTACGGTAGACTTG-3' (Oligo GTF-R, SEQ ID NO 10)

10 Otro objeto de la presente invención lo constituye un kit de detección de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos caracterizado por que contiene una pareja de oligonucleótidos cebadores de la presente invención.

15 Finalmente, otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la pareja de oligonucleótidos cebadores y del procedimiento de la presente invención para la detección de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos de interés industrial que permitan tomar decisiones en el ámbito de la calidad alimentaria, preferentemente, y a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, en el sector de los productos lácteos, avena o de bebidas alcohólicas (vino, sidra, cerveza, etc), tanto para asegurar la caracterización de las cepas que pueden formar parte de un cultivo iniciador como para controlar los procesos de fermentación una vez iniciados y los productos finales como son los alimentos ya elaborados por ejemplo productos lácteos como el queso y el yogurt, entre otros, vinos, sidras, cervezas, etc, y determinar la existencia de trazas previas o presentes de cepas productoras de β -glucanos. Este procedimiento
20 puede permitir un control sanitario y de la calidad de los alimentos como un ahorro económico a las empresas que pueden desechar determinados procesos de producción a tiempo.

Descripción de los dibujos

25 Figura 1.- *Detección de la localización génica del gen gtf en bacterias ácido lácticas por hibridación de Southern*. Fotografías del gel de agarosa al 0,6% teñido con bromuro de etidio (A) y del autorradiograma de la membrana hibridada (B). Calles: 1, estándar de peso molecular (Smartladder, Eurogentec); 2, preparación plasmídica de *P. damnosus* 2.6; 3, preparación plasmídica de *P. damnosus* 2.6NR (estirpe derivada de 2.6 y carente del plásmido pPD2); 4, preparación de DNA genómico de *P. damnosus* 2.6; 5, preparación de DNA genómico de *P. damnosus* 2.6NR, 6,
30 preparación de DNA genómico de *Lb. sp.* G77; 7, preparación de DNA genómico de *O. oeni* 14. Se indica la posición de los cromosomas bacterianos y de los plásmidos pPD1, pPD2 y pPD3 de *P. damnosus* 2.6 y pLB1 de *Lb. sp.* G77.

Figura 2.- *Detección por PCR del gen gtf y regiones adyacentes en los genomas de bacterias ácido lácticas*. Fotografías del análisis en geles de agarosa al 0,8% de reacciones de PCR realizadas utilizando los oligonucleótidos:
35 GTF-F y GTF-R en (A); A y B en (B) y C y B en (C) y preparaciones de DNA genómico. Calles en (A) y (C): 1, estándar de peso molecular (Smartladder, Eurogentec); 2, *P. damnosus* 2.6; 3, *Lb. sp.* G77; 4, *O. oeni* 14. Calles en (B): 1, estándar de peso molecular (Smartladder, Eurogentec); 2, *P. damnosus* 2.6; 3, *O. oeni* 14; 4, *Lb. sp.* G77. Se indica la longitud de los fragmentos de PCR obtenidos.

40 Figura 3.- *Detección por PCR de bacterias portadoras del gen gtf en sidra*. Fotografía del análisis en gel de agarosa al 0,8% de las reacciones de PCR realizadas con los oligonucleótidos GTF-F y GTF-R y con DNA aislado de: sidra inoculada con *P. damnosus* 2.6 (calle 2) y dos lotes de sidras ahiladas (calles 3 y 4). Calle 1, estándar de peso molecular (Smartladder, Eurogentec). Se indica la longitud de los fragmentos de PCR obtenidos.

45 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo del alcance de la misma.

Ejemplos de realización

50 Ejemplo 1

Clonaje y caracterización del gen gtf de P. damnosus 2.6

El clonaje de la región 5' del gen se realizó por amplificación de PCR utilizando el DNA total de los plásmidos portados por *P. damnosus* 2.6 y los oligonucleótidos degenerados 5'-TAYGAYAAYACNCARGARGT-3' (Oligo degA, SEQ ID NO 1) y 5'-ACRAARTARTCRTARTCRTG-3' (Oligo degB, SEQ ID NO 2) (Y = T o C; W; R = A o G; N = A, C, G o T). Estos oligonucleótidos fueron diseñados en base a la secuencia de aminoácidos conservada de la glicosiltransferasa de *P. damnosus* IOEB8801 (Walling *et al.* (2001) Lait 81: 289-300), ya que la secuencia de nucleótidos del gen codificante no ha sido publicada, ni depositada en los bancos de datos de secuencias de DNA. El fragmento amplificado de 1,8 kb fue clonado en el vector pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) y el plásmido recombinante obtenido fue establecido en *Escherichia coli* DH5 α . La determinación de la secuencia de nucleótidos del fragmento de DNA reveló la existencia de un marco de lectura abierta carente de su región amino terminal. La secuencia de DNA obtenida fue utilizada para sintetizar los oligonucleótidos 5'-ACGCCCTGCGTGTTATCATA-3' (Oligo III, SEQ ID NO 3) y 5'-TGTGTAATGGCACTCACGAC-3' (Oligo IV, SEQ ID NO 4) y mediante reacción de PCR reversa se
65 amplificó el extremo 5' del gen *gtf*, que fue clonado utilizando el mismo vector, método y bacteria huésped que se emplearon para clonar el extremo 3' del gen. La secuencia de 3352 nucleótidos de las regiones clonadas se muestra en la SEQ ID NO 5 (Secuencia *gtf*). La secuencia del gen *gtf* se muestra en la secuencia SEQ ID NO 16 (Gen *gtf*). El gen *gtf* codifica la proteína GTF de 567 aminoácidos detallados en la SEQ ID NO 6. La comparación de su secuencia

ES 2 315 038 A1

de aminoácidos (inferida de la secuencia del gen *gtf*) con la base de datos Swissprot reveló que GFT pertenece a la familia COG1215 de glicosiltransferasas.

5 Ejemplo 2

Localización del gen gtf en Pediococcus, Lactobacillus y Oenococcus productores de β-glucano

Con el objeto de determinar la localización genómica del gen *gtf* en *P. damnosus* 2.6 y la presencia del mismo en
10 *Lb. sp. G77* y *O. oeni* 14, los extractos de DNA totales de las distintas estirpes y de la estirpe *P. damnosus* 2.6 (curada del plásmido EPS) fueron fraccionados en geles de agarosa del 0,6% y después de teñir el gel con bromuro de etidio fueron transferidos a una membrana de nylon de 0,45 μm (Biodyne A, Pall Corporation) e hibridados con una sonda generada a partir de un producto de PCR de 5,98 kb con los cebadores 5'-TTGCCAGAACTAGAGAAAGTACGCA-3' (Oligo V, SEQ ID NO 7) y 5'-ACTTCCTATTTAGCTAAAAAGCAA-3' (Oligo VI, SEQ ID NO 8) y utilizando
15 el Kit NEBlot Phototope (BioLabs). Los fragmentos hibridados fueron revelados utilizando el Kit Phototope Stars Detection (Biolabs). Los resultados obtenidos están recogidos en la Figura 1. En las tres estirpes productoras de EPS analizadas se detectó una banda de hibridación localizada en distintas posiciones. La comparación de la imagen del gel de agarosa teñido (Figura 1A) con la de la membrana hibridada (Figura 1B) reveló que el gen *gtf* estaba localizado en un plásmido de 35 kb en *P. damnosus* 2.6 denominado pPD2, en un plásmido de 5,5 kb (denominado pLB1) en *Lb. sp. G77* y en otra localización genómica en *O. oeni* 14.

Los oligonucleótidos denominados GTF-F y GTF-R fueron diseñados como parte de esta patente de invención para detectar bacterias productoras de EPS a partir de la secuencia de DNA del gen *gtf* de la presente invención (SEQ ID NO 16). Uno de ellos, denominado GTF-F tiene una longitud de 20 nucleótidos y su secuencia es 5'-
25 CGGTAATGAAGCGTTTCCTG-3' (Oligo GTF-F, SEQ ID NO 9). El otro cebador denominado GTF-R tiene una longitud de 18 nucleótidos y su secuencia es 5'-GCTAGTACGGTAGACTTG-3' (Oligo GTF-R, SEQ ID NO 10). Estos cebadores permiten la amplificación de un fragmento de DNA de 0,45 kb del gen *gtf* de *P. damnosus* 2.6 y fueron utilizados para confirmar la presencia de este gen en *Lb. sp. G77*, *P. damnosus* 2.6 y *O. oeni* 14. Para ello, se prepararon extractos de DNA genómico de dichas bacterias a partir de cultivos crecidos en medio MRS (Oxoid)
30 a una a una A₆₅₀ de 1,0. Doce ml de cada uno de los cultivos fueron sedimentados por centrifugación a 13603 x g durante 10 minutos y las células fueron lisadas por resuspensión en 1 ml de solución I (50 mM Tris-Hcl pH 8, 10 mM EDTA, 30 mg de lisozima), incubación a 37°C durante 30 minutos y tratamiento con SDS al 2,5% durante un minuto a 37°C. Los extractos totales fueron desproteinizados por tratamiento 1:1 (v/v) con una mezcla 1:1 (v/v) de fenol:cloroformo/alcohol isoamílico (24/1) durante 5 minutos a temperatura ambiente y posterior centrifugación
35 a 13603 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa conteniendo el DNA fue concentrada por precipitación con etanol al 68% y 0,3 M acetato sódico 6.0 durante 30 minutos a -20°C y posterior centrifugación a 13603 x g durante 15 minutos a -10°C. El precipitado fue lavado con etanol al 70% y sedimentado por centrifugación a 13603 x g durante 15 minutos a -10°C. Finalmente, el DNA fue resuspendido en 200 μl de tampón TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA). Un μl del DNA obtenido fue empleado como sustrato junto con los cebadores GTF-F y GTF-R
40 para realizar la amplificación por PCR, empleando la DNA polimerasa DyNAzyme (Finnzymes) y tal como se indica posteriormente. El análisis de los productos de PCR en geles de agarosa al 0,8% reveló la existencia del fragmento de 0,45 kb del gen *gtf* esperado en las tres bacterias analizadas (Figura 2A).

Con el objeto de comprobar si el gen *mob* del plásmido pF8801 (EPS) de 5,5 kb de *P. damnosus* IOEB18801
45 (Gindreau y cols. (2001) J Appl. Microbiol. 90: 535-542) está adyacente al gen *gtf* en otras bacterias, se realizaron amplificaciones de PCR utilizando los cebadores: A (5'-TCTCATCAAGATGAACAATTGC-3') (Oligo VI, SEQ ID NO 11) y B (5'-ACGCCCTGCGTGTATCATA-3') (Oligo VIII, SEQ ID NO 12), cuyas secuencias están incluidas respectivamente en el gen *mob* de *P. damnosus* IOEB18801 (Gindreau y cols. (2001) J. Appl. Microbiol. 90: 535-542) y en el gen *gtf* de *P. damnosus* 2.6. El análisis de los productos de PCR reveló que sólo se había generado el fragmento
50 de amplificación de 1,26 kb esperado (Figura 2B) en las reacciones conteniendo como sustrato el DNA de *Lb. sp. G77* y que no existía amplificación en las muestras conteniendo DNA de *P. damnosus* 2.6 y *O. oeni* 14. Con el fin de determinar si el gen *mobA* de *P. damnosus* 2.6, estaba también adyacente al gen *gtf* en las estirpes *Lb. sp. G77* y *O. oeni* 14, se llevaron a cabo amplificaciones utilizando los cebadores: C, (5'-CAACAAGCCAAGGACGACGACCA-3') (Oligo IX, SEQ ID NO 13) y B, cuyas secuencias están incluidas respectivamente en los genes *mobA* y *gtf* de *P. damnosus* 2.6. El análisis de los productos de PCR reveló que sólo se había generado el producto de amplificación
55 esperado de 1,35 Kb (Figura 2C) en la reacción conteniendo como sustrato el DNA de *P. damnosus* 2.6 y que no existía amplificación en las reacciones que contenían como sustrato el DNA de *Lb. sp. G77* y *O. oeni* 14.

Los resultados obtenidos muestran, que el gen *gtf* tiene una localización genómica diferente en distintas estirpes
60 de *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Oenococcus* aisladas de sidra y que la utilidad del método molecular desarrollado por Gindreau y cols. (J. Appl. Microbiol. (2001) 90: 535-542), basado en la detección de regiones adyacentes al gen *gtf* es muy limitada, ya que no puede ser usado como método general para detectar estirpes aisladas de sidra productoras de β-glucano.

65

Ejemplo 3

Procedimiento de detección en bacterias del gen gtf por PCR

5 La secuencia de nucleótidos de los genes *gtf* de *Lb. sp. G77* y *O. oeni* 14 fue determinada por amplificación de los genes por PCR con los oligonucleótidos 5'-TCTAGAAATTAAGGAATGTGTAA-3' (Oligo X, SEQ ID NO 14) y 5'-TCTAGATTAATCATTCCAATCAACTG-3' (Oligo XI, SEQ ID NO 15) y posterior secuenciación de los fragmentos amplificados. Los resultados obtenidos (no mostrados) revelaron que los genes de *Lb. sp. G77* y *O. Oeni* 14 poseen una homología de más del 99% con el gen *gtf* de *P. damnosus* 2.6. La secuencia de los oligonucleótidos GTF-F y GTF-R aparecía conservada en los genes de los tres géneros bacterianos. Este hecho junto con los resultados mostrados en la Figura 2A indicaban que los antedichos oligonucleótidos podrían ser utilizados para amplificar específicamente el gen *gtf*. Para estandarizar las condiciones de detección se utilizó DNA genómico de las tres bacterias objeto de estudio. Se comprobó que los oligonucleótidos GTF-F y GTF-R a una concentración de 0,2 μ M, daban lugar en todos los casos a un único producto de amplificación de 0,45 kb, cuando se realizaron las reacciones de PCR con la DNA polimerasa BIOTAQ (BIOLINE) y se utilizaban las siguientes condiciones en la amplificación: una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C seguida de 30 ciclos de amplificación consistentes en desnaturalización (1 minuto a 95°C), anillamiento de los cebadores (1,5 minutos a 50°C) y extensión (0,5 minutos a 72°C) y un período final de 10 minutos a 72°C para completar la síntesis de todas las cadenas de DNA.

20 Este método de PCR puede utilizarse para amplificar DNA obtenido de cualquier cepa bacteriana que contenga el gen *gtf*, como *P. damnosus* 2.6. En este caso, el límite de detección del producto de PCR es de 1 pg de DNA genómico total de *P. damnosus* 2.6.

25 También fue posible amplificar el DNA obtenido por un procedimiento más sencillo y rápido, consistente en un tratamiento de las bacterias con la resina Chelex. El procedimiento consiste en la resuspensión de varias colonias en cien microlitros de agua estéril, mezcla 1:1 (v/v) con la resina Instagene-Matrix (Bio Rad) y calentamiento a 80°C durante diez minutos. Los restos celulares de las muestras de DNA son eliminados por centrifugación a 13603 x g durante 5 minutos a 4°C. De 5 a 10 μ l del sobrenadante, que contiene el DNA, son suficientes para obtener un producto de amplificación utilizando las condiciones descritas más arriba.

Ejemplo 4

Detección del gen gtf en una colección de cepas aisladas de sidra y en bacterias pertenecientes a colecciones tipo

35 Para validar el método desarrollado se amplificó DNA obtenido a partir de colonias de una colección de 40 LAB consistente en cepas de referencia de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), de la National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB) y del Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL) pertenecientes a distintas especies de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Streptococcus*, así como cepas aisladas de sidras ahiladas de la Colección de Bacterias Lácticas de la Universidad del País Vasco (CLUPV). Estas colecciones incluyen cepas con fenotipos productor de exopolisacárido (EPS⁺), en alguna de las cuales se ha caracterizado la naturaleza de éste, y no productor de exopolisacáridos (EPS⁻). En la Tabla 1 se recogen los resultados obtenidos. En 24 estirpes productoras de EPS⁺: 14 *Lactobacillus* EPS⁺, 9 *Pediococcus* y el único *O. Oeni* productor de exopolisacárido del que se dispone en la colección se detectó la presencia del gen *gtf*. Sin embargo, no se detectó amplificación del gen *gtf* en las reacciones de: las 11 estirpes EPS⁻ analizadas, las 3 bacterias productoras de heteropolisacáridos y de los 2 *Leuconostoc mesenteroides* productores de homopolisacáridos compuestos por unidades de α -glucano. Estos resultados muestran que el método desarrollado permite específicamente la detección de estirpes portadoras de *gtf* y e indica que la proteína GTF está implicada específicamente en la biosíntesis de homopolisacáridos constituidos por β -glucano y no otro tipo de homo- o hetero-polisacáridos.

TABLA I

Detección de la presencia del gen gtf en bacterias productoras de EPS mediante amplificación de PCR

| BACTERIA | REFERENCIA | FENOTIPO/TIPO EXOPOLISACARIDO | PCR (detección <i>gtf</i>) |
|-----------------------------|------------|--|-----------------------------|
| <i>Pediococcus damnosus</i> | CLUPV #2.6 | EPS ⁺ /homopolisacárido (β -glucano) | Positivo |
| <i>P. damnosus</i> | CECT 4693 | EPS ⁺ | Positivo |
| <i>Pediococcus</i> sp. | CLUPV #P1 | EPS ⁺ | Positivo |
| <i>Pediococcus</i> sp. | CLUPV #P3 | EPS ⁺ | Positivo |

ES 2 315 038 A1

| | | | | |
|----|--|--------------|--|----------|
| | <i>Pediococcus</i> sp. | CLUPV #P4 | EPS+ | Positivo |
| | <i>Pediococcus</i> sp. | CLUPV #P8 | EPS+ | Positivo |
| 5 | <i>Pediococcus</i> sp. | CLUPV #P10 | EPS+ | Positivo |
| | <i>Pediococcus</i> sp. | CLUPV #P11 | EPS+ | Positivo |
| | <i>Pediococcus</i> sp. | CLUPV #P13 | EPS+ | Positivo |
| | <i>P. damnosus</i> | CECT 4694 | EPS- | Negativo |
| 10 | <i>P. pentosaceus</i> | CECT 4695T | EPS- | Negativo |
| | <i>P. parvulus</i> | CECT 4794 | EPS- | Negativo |
| | <i>P. pentosaceus</i> | CECT 4692 | EPS- | Negativo |
| | | | | |
| 15 | <i>Lactobacillus</i> sp. | CLUPV #G77 | EPS+/homopolisacárido (β -glucano) | Positivo |
| | <i>Lactobacillus</i> sp. | CLUPV #L1 | EPS+ | Positivo |
| | <i>Lactobacillus</i> sp. | CLUPV #L2 | EPS+ | Positivo |
| 20 | <i>Lactobacillus</i> sp. | CLUPV #L3 | EPS+ | Positivo |
| | <i>Lactobacillus</i> sp. | CLUPV #L4 | EPS+ | Positivo |
| | <i>Lactobacillus</i> sp. | CLUPV #L5 | EPS+ | Positivo |
| | <i>Lactobacillus</i> sp. | CLUPV #L6 | EPS+ | Positivo |
| 25 | <i>Lactobacillus</i> sp. | CLUPV #L7 | EPS+ | Positivo |
| | <i>Lactobacillus</i> sp. | CLUPV #L8 | EPS+ | Positivo |
| | <i>Lactobacillus</i> sp. | CLUPV #L12 | EPS+ | Positivo |
| | <i>Lactobacillus</i> sp. | CLUPV #L13 | EPS+ | Positivo |
| 30 | <i>Lactobacillus</i> sp. | CLUPV #L15 | EPS+ | Positivo |
| | <i>Lactobacillus</i> sp. | CLUPV #L16 | EPS+ | Positivo |
| | <i>Lactobacillus</i> sp. | CLUPV #L17 | EPS+ | Positivo |
| 35 | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | NCIMB 700772 | EPS+/heteropolisacárido | Negativo |
| | <i>Lb. helveticus</i> | NCIMB 700766 | EPS+/heteropolisacárido | Negativo |
| | <i>Lb. brevis</i> | CECT 216 | EPS- | Negativo |
| 40 | <i>Lb. plantarum</i> | CECT 223 | EPS- | Negativo |
| | <i>Lb. collinoides</i> | CECT 922T | EPS- | Negativo |
| | <i>Lb. mali</i> | CECT 4149 | EPS- | Negativo |
| 45 | <i>Lb. hilgardii</i> | CECT 4786 T | EPS- | Negativo |
| | | | | |
| | <i>Oenococcus oeni</i> | CLUPV#14 | EPS+/homopolisacárido (β -glucano) | Positivo |
| 50 | <i>O. oeni</i> | CECT 218 | EPS- | Negativo |
| | | | | |
| | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> | CECT 394 | EPS+/homopolisacárido (α -glucano) | Negativo |
| 55 | <i>Leu. mesenteroides</i> | NRRL B7 42 | EPS+/homopolisacárido (α -glucano) | Negativo |
| | <i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> | CECT 873 | EPS- | Negativo |
| | | | | |
| 60 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | NCIMB 700859 | EPS+/heteropolisacárido | Negativo |

65

Ejemplo 5

Método de detección de cepas portadoras del gen gtf en sidra

5 Se ha estandarizado un procedimiento con el objeto de establecer un método de detección directa de producción de EPS en sidra, sin aislamiento de las cepas productoras. El procedimiento 1, consiste en sedimentar las bacterias presentes en un 1 ml de sidra por centrifugación a 13603 x g durante 5 minutos, lavado del sedimento por resuspensión en 1 ml de NaCl al 0.9% y centrifugación a 13603 x g durante 5 minutos, seguido de una resuspensión de las células en 200 μ l de la resina Instagene-Matrix (BioRad), incubación a 56°C durante 30 minutos y eliminación de los restos
10 celulares por centrifugación a 11591 x g durante 5 min. El sobrenadante, que contiene el DNA, es posteriormente tratado con 5 mg de polivinilpirrolidona por adición del compuesto, agitación y centrifugación a 13603 x g durante 10 minutos. Este tratamiento permite eliminar por sedimentación los inhibidores de las DNA polimerasas (utilizadas en las reacciones de PCR). que están presentes en bebidas alcohólicas. Así, 5 μ l de los sobrenadantes tratados permiten la detección del gen *gtf* en una reacción de PCR de 50 μ l realizada en las condiciones mencionadas. En la Figura 3 se observa el resultado de aplicar este método de PCR al DNA de bacterias lácticas obtenido a partir de: 1) una sidra
15 inoculada con 10^8 CFU.ml⁻¹ *P. damnosus* 2.6 (Figura 3, calle 1) o dos lotes de sidra ahilada (Figura 3, calles 2 y 3).

Finalmente, utilizando sidras inoculadas con *P. damnosus* 2.6 ha sido posible establecer que el límite de detección de este nuevo método es la presencia en la sidra de 3×10^2 UFC. ml⁻¹ bacterias conteniendo el gen *gtf*.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de detección molecular de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos **caracterizado** por el uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con una pareja de oligonucleótidos cebadores específicos del gen *gtf* (SEQ ID NO 16) de *Pediococcus damnosus* 2.6.

10 2. Procedimiento de detección molecular de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la pareja de oligonucleótidos cebadores está constituida por los oligonucleótidos GTF-F (SEQ ID NO 9) y GTF-R (SEQ ID NO 10).

15 3. Procedimiento de detección molecular de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos según las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** porque la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realiza bajo unas condiciones adecuadas de amplificación del fragmento de doble cadena flanqueado por dichos oligonucleótidos, como por ejemplo, las siguientes:

- un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos.
- 30 ciclos:
 - 20 ■ Desnaturalización a 95°C (1 minuto)
 - Anillamiento a 50°C (1,5 minutos)
 - 25 ■ Extensión a 72°C (0,5 minutos)
- Incubación a 72°C durante 10 minutos para permitir la finalización de todas las cadenas iniciadas previamente.

30 4. Procedimiento de detección molecular de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos según las reivindicaciones 1 a la 3 **caracterizado** porque utiliza como material de partida el DNA extraído de una colonia bacteriana.

35 5. Procedimiento de detección molecular de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos según las reivindicaciones 1 a la 3 **caracterizado** porque utiliza como material de partida el DNA extraído de las bacterias y purificado.

6. Procedimiento de detección molecular de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos según las reivindicaciones 1 a la 3 **caracterizado** porque utiliza como material de partida el DNA extraído de cualquier alimento.

40 7. Pareja de nucleótidos cebadores específicos del gen *gtf* de *P. damnosus* 2.6 **caracterizada** porque está constituida por los siguientes oligonucleótidos:

-5'-CGGTAATGAAGCGTTTCCTG-3' (Oligo GTF-F, SEQ ID NO 9)

45 -5'-GCTAGTACGGTAGACTTG-3' (Oligo GTF-R, SEQ ID NO 10)

8. Kit de detección de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos **caracterizado** porque contiene una pareja de oligonucleótidos cebadores según la reivindicación 7 y porque permite la realización del procedimiento según las reivindicaciones 1 a la 6.

50 9. Uso del procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6 para la detección de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos de interés industrial.

55 10. Uso del procedimiento según la reivindicación 9 para la detección de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos **caracterizado** porque las bacterias son estirpes productoras de β -glucanos de interés para las industrias de alimentos del sector de productos lácteos.

60 11. Uso del procedimiento según la reivindicación 9 para la detección de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos **caracterizado** porque las bacterias son estirpes productoras de β -glucanos de interés para las industrias de alimentos del sector de la avena.

65 12. Uso del procedimiento según la reivindicación 9 para la detección de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos **caracterizado** porque las bacterias son estirpes productoras de β -glucanos de interés para las industrias de alimentos del sector de las bebidas alcohólicas.

13. Uso del procedimiento según la reivindicación 12 **caracterizado** porque las bebidas alcohólicas pertenecen al siguiente grupo: vino, sidra y cerveza.

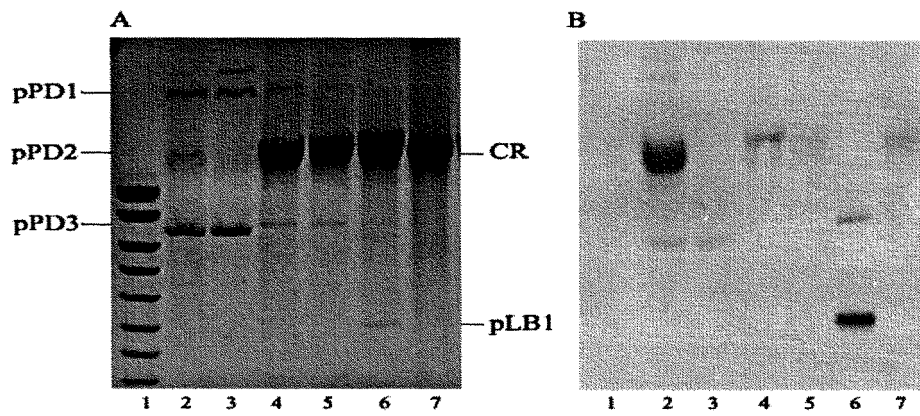


Figura 1

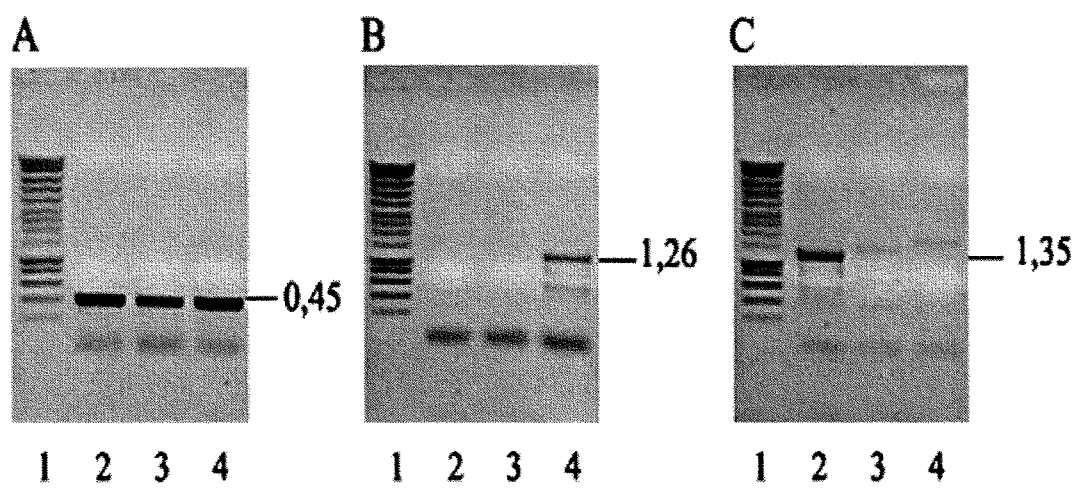


Figura 2

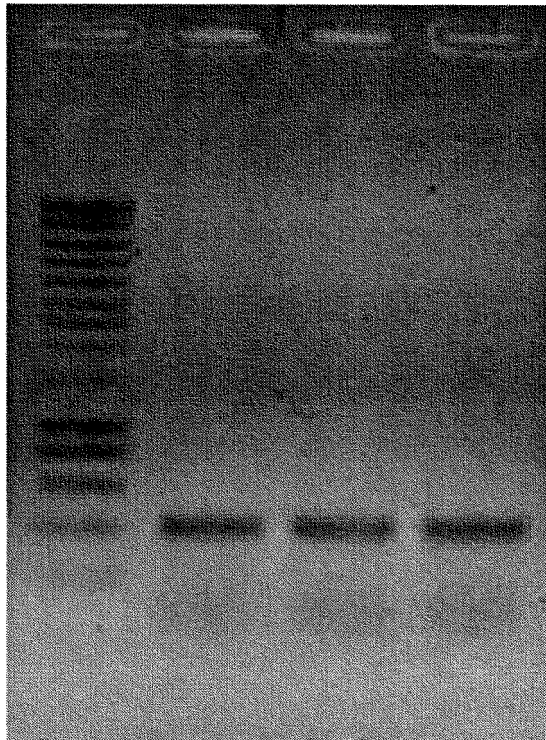


Figura 3

ES 2 315 038 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
- <120> PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PRODUCTO-
RAS DE β -GLUCANOS
- 10 <130> Reacción de polimerización en cadena para detectar gtf
- <160> 16
- 15 <170> Patente de Invención versión 3.2
- <210> 1
<211> 20
20 <212> DNA
<213> Secuencia artificial utilizada como cebador en experimentos de amplificación
- <220>
25 <223> Oligonucleótidos degA
- <220>
30 <221> Características varias
<222> (12)..(12)
<223> n es a, c, g, o t
- 35 <400> 1
taygayaaya cncargargt 20
- <210> 2
40 <211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial utilizada como cebador en experimentos de amplificación
- 45 <220>
<223> Oligonucleótido degB
- <220>
50 <221> Características varias
<222> (12)..(12)
<223> n es a, c, g, o t
- 55 <400> 2
taygayaaya cncargargt 20
- <210> 3
60 <211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia utilizada como cebador en experimentos de amplificación
- 65 <220>
<223> Oligonucleótido III

ES 2 315 038 A1

<400> 3
 acgccctgcg tgttatcata 20

5 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia utilizada como cebador en experimentos de amplificación

10 <220>
 <223> Oligonucleótido IV

15 <400> 4 20
 tgtgtaatgg cactcacgac

 <210> 5
 20 <211> 3352
 <212> DNA
 <213> *Pediococcus damnosus*

25 <220>
 <221> CDS
 <222> (1282)..(2982)

30 <400> 5

 tgacaacacg caggaagttt taagaagagc ctttcctaac ggtaatttta atgaattacc 60
 35 aatgattaaa caggaacaag cctatacagc cgtgatgtac tatgatcctg ttttaaagcc 120
 atgtcaggct gaaacaattg aacagtggca agcaaatcca ccacaggtgt tcgggtcccc 180
 40 agaacatcaa caaggactag cttatttatc ggggcagctt agcttagatc agttagaaaa 240
 tcatcactta caacggggtt taaagcatga tggcactaaa caactctttt ttggcgaatg 300
 caaagccgat ccgacgatta agaacagtca gatcgagaaa atccaaaagc agttaaaggg 360
 45 gcaacaagcc aaggacgacc agtatagaaa agtaaattatt ggacattatc aaccgctaaa 420
 ttacaagcca gttagtccaa gctaccactt aaagacggcc tttagtaacg caatcatgac 480
 50 cgccctatat gcccgatgatg aagattacga acggcaaaaa caggcgcaag gtttaaagga 540
 gactgagtgg gaaatgacga aaaagcaacg gcaacaccaa actcgaacc ggcatgaaga 600
 55 tgggggcatg cacttgtaat ctaaattgtaa aattaaagt gcaccaacgt gtcatttaa 660
 tgggtacaatg aaccataat atagggaaaag gagtattcac atgtgacaaa gaaacaggaa 720
 60 tggtttagct tagctcaagc tagtctcaag cttgaacgag gtagtacgta cgtgagtgtt 780
 tggttaagac ggcaccctaa cgagttgcca agtgaaatgc tcatggaaac gggcaaagtt 840
 65 aaattaatat ctgaagatgg cattgaatgg attaaaaacc acataaaaaa agagggcgtc 900

ES 2 315 038 A1

| | | |
|----|--|------|
| | ctcgtaaagca gtgaagttgc taacggggat cagcacctgg aagttacgat tctaggtgtc | 960 |
| | accctcctaa caatccattt taccgggocgg gttaggggaa agctagtgga tcctaattgt | 1020 |
| 5 | tcaaaaaaca gcgaaaagac aaacgacgcg atactgocgc aaaactcagc cattgttttc | 1080 |
| | taaggattaa gtcttttgga ttttgtgtat ctatcaactc cttaaagcct tctgagtcct | 1140 |
| 10 | ataataacc aaagtgatc tataaaatgc tctacgtoga tttaccggtg accgatagtt | 1200 |
| | gaatagctca cggttagcta aaatatcgtt aaatgaaaaa tggaatattt tatggaaaaa | 1260 |
| 15 | aattaaagga atgtagtata a atg tta aat gat aat gat tca gaa cta aaa | 1311 |
| | Met Leu Asn Asp Asn Asp Ser Glu Leu Lys | |
| | 1 5 10 | |
| 20 | aaa ttt cac ttg ttt cat tct aaa cca gtc ttt gta cca gtt att tta | 1359 |
| | Lys Phe His Leu Phe His Ser Lys Pro Val Phe Val Pro Val Ile Leu | |
| | 15 20 25 | |
| 25 | att att tgg ttg ttt att atg tgc tta tat gaa tat tta aca tac aca | 1407 |
| | Ile Ile Trp Leu Phe Ile Met Cys Leu Tyr Glu Tyr Leu Thr Tyr Thr | |
| | 30 35 40 | |
| 30 | gat agc ata ctt cct att tta gct aaa aag caa cca cta gaa gta att | 1455 |
| | Asp Ser Ile Leu Pro Ile Leu Ala Lys Lys Gln Pro Leu Glu Val Ile | |
| | 45 50 55 | |
| 35 | tta cct ata ttc aat caa tta ttt gtg gca ctt ttc ttt ttg ctt gga | 1503 |
| | Leu Pro Ile Phe Asn Gln Leu Phe Val Ala Leu Phe Phe Leu Leu Gly | |
| | 60 65 70 | |
| 40 | ata act aat att att atc gct atc cgc tat gca atg att aaa gac aaa | 1551 |
| | Ile Thr Asn Ile Ile Ile Ala Ile Arg Tyr Ala Met Ile Lys Asp Lys | |
| | 75 80 85 90 | |
| 45 | gca aaa gaa tcc gaa cta gca ata ctc gca aaa gaa acg cct gca gac | 1599 |
| | Ala Lys Glu Ser Glu Leu Ala Ile Leu Ala Lys Glu Thr Pro Ala Asp | |
| | 95 100 105 | |
| 50 | tgg cac cct aaa gtt gag tta ttg tat acg acc tat aat gat ttt ata | 1647 |
| | Trp His Pro Lys Val Glu Leu Leu Tyr Thr Thr Tyr Asn Asp Phe Ile | |
| | 110 115 120 | |
| 55 | cct tat gca cta gct caa tgt tta aaa cag aca tat gat aac acg cag | 1695 |
| | Pro Tyr Ala Leu Ala Gln Cys Leu Lys Gln Thr Tyr Asp Asn Thr Gln | |
| | 125 130 135 | |
| 60 | ggc gtt att ttg gat aac tct aca gac ccc aaa tac atc aag atg att | 1743 |
| | Gly Val Ile Leu Asp Asn Ser Thr Asp Pro Lys Tyr Ile Lys Met Ile | |
| | 140 145 150 | |
| 65 | gat gat ttt gtg ata gcc cat cct aat gta aag tta gtc aga gat tct | 1791 |
| | Asp Asp Phe Val Ile Ala His Pro Asn Val Lys Leu Val Arg Asp Ser | |
| | 155 160 165 170 | |
| 65 | caa aac aag cat gct aaa gct gga aac tta aac aat tat ttg tgt aat | 1839 |
| | Gln Asn Lys His Ala Lys Ala Gly Asn Leu Asn Asn Tyr Leu Cys Asn | |
| | 175 180 185 | |

ES 2 315 038 A1

| | | |
|----|---|------|
| | ggc act cat gac tac gat tac ttt gtt atc cta gat agc gat gaa tta | 1887 |
| | Gly Thr His Asp Tyr Asp Tyr Phe Val Ile Leu Asp Ser Asp Glu Leu | |
| | 190 | 195 |
| 5 | tta gaa aat aga ttt gta gaa aaa tgt tta aag atg ttt tat tac aat | 1935 |
| | Leu Glu Asn Arg Phe Val Glu Lys Cys Leu Lys Met Phe Tyr Tyr Asn | |
| | 205 | 210 |
| 10 | gat att ggc att ctt cag tgt aat cac att agt gga caa aac cac aat | 1983 |
| | Asp Ile Gly Ile Leu Gln Cys Asn His Ile Ser Gly Gln Asn His Asn | |
| | 220 | 225 |
| 15 | tcg ttt atg cgt act ttc tct agt tct ggc aat att ttt tgg cca gtg | 2031 |
| | Ser Phe Met Arg Thr Phe Ser Ser Ser Gly Asn Ile Phe Trp Pro Val | |
| | 235 | 240 |
| 20 | caa aac gtt gta cga agc gtt gaa ggt ggc tgg tta aat aaa act gtg | 2079 |
| | Gln Asn Val Val Arg Ser Val Glu Gly Gly Trp Leu Asn Lys Thr Val | |
| | 255 | 260 |
| 25 | tct ggc gtt tct gta ggc caa act gga ggt gca tta tgt att gaa tta | 2127 |
| | Ser Gly Val Ser Val Gly Gln Thr Gly Gly Ala Leu Cys Ile Glu Leu | |
| | 270 | 275 |
| 30 | ggt cat ggc gtc atg att tca cgt gaa tgc ttt gaa gat att gga caa | 2175 |
| | Gly His Gly Val Met Ile Ser Arg Glu Cys Phe Glu Asp Ile Gly Gln | |
| | 285 | 290 |
| 35 | ata ccc tat gcg gtg gca gaa gac ctt tgt act tct att gaa gct aca | 2223 |
| | Ile Pro Tyr Ala Val Ala Glu Asp Leu Cys Thr Ser Ile Glu Ala Thr | |
| | 300 | 305 |
| 40 | cta aaa ggc tgg aac att aaa ttt gct tca caa att tac ggt aat gaa | 2271 |
| | Leu Lys Gly Trp Asn Ile Lys Phe Ala Ser Gln Ile Tyr Gly Asn Glu | |
| | 315 | 320 |
| 45 | gcg ttt cct gtt aat atg gca gca tta atg att aga tct agt aag ttt | 2319 |
| | Ala Phe Pro Val Asn Met Ala Ala Leu Met Ile Arg Ser Ser Lys Phe | |
| | 335 | 340 |
| 50 | tgt tct gca aat ttt gaa ttt ttt aaa aaa tat tcg gcg aga atc atc | 2367 |
| | Cys Ser Ala Asn Phe Glu Phe Phe Lys Lys Tyr Ser Ala Arg Ile Ile | |
| | 350 | 355 |
| 55 | aag tca aag acc ata agt ctc tat caa aaa atc gac ttg ttt tgt ttt | 2415 |
| | Lys Ser Lys Thr Ile Ser Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Leu Phe Cys Phe | |
| | 365 | 370 |
| 60 | acc cta tca gtt cca ata agt gct ttt caa tat att agc tta gtt att | 2463 |
| | Thr Leu Ser Val Pro Ile Ser Ala Phe Gln Tyr Ile Ser Leu Val Ile | |
| | 380 | 385 |
| 65 | act agt ata att tgt cca gtg ttg cac att cca cta gta aca caa tta | 2511 |
| | Thr Ser Ile Ile Cys Pro Val Leu His Ile Pro Leu Val Thr Gln Leu | |
| | 395 | 400 |
| 70 | ttt atg tta tta cca acg tta gtc tgt tac ttt agt caa agt ttg gtc | 2559 |
| | Phe Met Leu Leu Pro Thr Leu Val Cys Tyr Phe Ser Gln Ser Leu Val | |
| | 415 | 420 |

ES 2 315 038 A1

```

gat act gtc ttt cat ttg aca aac ggt atg aaa ttc tta gat tta ttg 2607
Asp Thr Val Phe His Leu Thr Asn Gly Met Lys Phe Leu Asp Leu Leu
                430                      435                      440

5   att tat gaa gta gaa tca atg ttg tta tat ggg tct ttt tat ttt att 2655
    Ile Tyr Glu Val Glu Ser Met Leu Leu Tyr Gly Ser Phe Tyr Phe Ile
                445                      450                      455

10  aca atc aag tct acc gta cta gct tta atg aac aaa cct gct aaa ttc 2703
    Thr Ile Lys Ser Thr Val Leu Ala Leu Met Asn Lys Pro Ala Lys Phe
                460                      465                      470

15  ata gtt aca ccg aag gtt aat gag cat ata act ttt ctg cat gca ata 2751
    Ile Val Thr Pro Lys Val Asn Glu His Ile Thr Phe Leu His Ala Ile
    475                      480                      485                      490

20  aga aat cat tat caa gga atc tta ttt tca ata ttt aca ata att gca 2799
    Arg Asn His Tyr Gln Gly Ile Leu Phe Ser Ile Phe Thr Ile Ile Ala
                495                      500                      505

25  tgt atc gca att tct gga agt tat tgg gta tta tta tca ttt att ccg 2847
    Cys Ile Ala Ile Ser Gly Ser Tyr Trp Val Leu Leu Ser Phe Ile Pro
                510                      515                      520

30  ggt tgt ttt ggg ttt ttg ttc gaa atg caa gct aat cat cgg aca tca 2895
    Gly Cys Phe Gly Phe Leu Phe Glu Met Gln Ala Asn His Arg Thr Ser
                525                      530                      535

35  gaa gaa caa ata aaa gcg gat aaa tta cag agt tac aac aat aag gca 2943
    Glu Glu Gln Ile Lys Ala Asp Lys Leu Gln Ser Tyr Asn Asn Lys Ala
                540                      545                      550

40  tta caa tct ggc aac acg gaa aca gtt gat tgg aat gat taaaattaca 2992
    Leu Gln Ser Gly Asn Thr Glu Thr Val Asp Trp Asn Asp
    555                      560                      565

tcattactat tttttagtagt aggagtaaaa aaggtagaaa gtcagaaatt ttaatctggg 3052

45  taaagtagtg aattgtttta tcgaatgata aactgctgaa tctattttat aacgaaggac 3112

acagcgcttt aatccgtatg caaaaagatg gctgaaaagg aaactcggct taaacagcat 3172

50  aaatgtcagt actgttttta cggatcaccg ggagtcagcg gttcagcttt taccagcatc 3232

cgctgttaca actgcagact ggcaccctaa agttgagtta ttgtatacga cctataatga 3292

ttttatacct tatgcactag ctcaatgttt aaaacagaca tatgataaca cgcagggcgt 3352

55  <210> 6
    <211> 567
    <212> PRT
60  <213> Pediococcus damnosus

    <400> 6

65  Met Leu Asn Asp Asn Asp Ser Glu Leu Lys Lys Phe His Leu Phe His
    1                      5                      10                      15

```

ES 2 315 038 A1

Ser Lys Pro Val Phe Val Pro Val Ile Leu Ile Ile Trp Leu Phe Ile
 20 25 30

5

Met Cys Leu Tyr Glu Tyr Leu Thr Tyr Thr Asp Ser Ile Leu Pro Ile
 35 40 45

10

Leu Ala Lys Lys Gln Pro Leu Glu Val Ile Leu Pro Ile Phe Asn Gln
 50 55 60

15

Leu Phe Val Ala Leu Phe Phe Leu Leu Gly Ile Thr Asn Ile Ile Ile
 65 70 75 80

20

Ala Ile Arg Tyr Ala Met Ile Lys Asp Lys Ala Lys Glu Ser Glu Leu
 85 90 95

25

Ala Ile Leu Ala Lys Glu Thr Pro Ala Asp Trp His Pro Lys Val Glu
 100 105 110

30

Leu Leu Tyr Thr Thr Tyr Asn Asp Phe Ile Pro Tyr Ala Leu Ala Gln
 115 120 125

35

Cys Leu Lys Gln Thr Tyr Asp Asn Thr Gln Gly Val Ile Leu Asp Asn
 130 135 140

40

Ser Thr Asp Pro Lys Tyr Ile Lys Met Ile Asp Asp Phe Val Ile Ala
 145 150 155 160

45

His Pro Asn Val Lys Leu Val Arg Asp Ser Gln Asn Lys His Ala Lys
 165 170 175

50

Ala Gly Asn Leu Asn Asn Tyr Leu Cys Asn Gly Thr His Asp Tyr Asp
 180 185 190

55

Tyr Phe Val Ile Leu Asp Ser Asp Glu Leu Leu Glu Asn Arg Phe Val
 195 200 205

60

Glu Lys Cys Leu Lys Met Phe Tyr Tyr Asn Asp Ile Gly Ile Leu Gln
 210 215 220

65

Cys Asn His Ile Ser Gly Gln Asn His Asn Ser Phe Met Arg Thr Phe
 225 230 235 240

Ser Ser Ser Gly Asn Ile Phe Trp Pro Val Gln Asn Val Val Arg Ser
 245 250 255

ES 2 315 038 A1

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Val | Glu | Gly | Gly | Trp | Leu | Asn | Lys | Thr | Val | Ser | Gly | Val | Ser | Val | Gly |
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | |
| 5 | Gln | Thr | Gly | Gly | Ala | Leu | Cys | Ile | Glu | Leu | Gly | His | Gly | Val | Met | Ile |
| | | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | |
| 10 | Ser | Arg | Glu | Cys | Phe | Glu | Asp | Ile | Gly | Gln | Ile | Pro | Tyr | Ala | Val | Ala |
| | | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | |
| 15 | Glu | Asp | Leu | Cys | Thr | Ser | Ile | Glu | Ala | Thr | Leu | Lys | Gly | Trp | Asn | Ile |
| | 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | 320 | |
| 20 | Lys | Phe | Ala | Ser | Gln | Ile | Tyr | Gly | Asn | Glu | Ala | Phe | Pro | Val | Asn | Met |
| | | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | |
| 25 | Ala | Ala | Leu | Met | Ile | Arg | Ser | Ser | Lys | Phe | Cys | Ser | Ala | Asn | Phe | Glu |
| | | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | |
| 30 | Phe | Phe | Lys | Lys | Tyr | Ser | Ala | Arg | Ile | Ile | Lys | Ser | Lys | Thr | Ile | Ser |
| | | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | |
| 35 | Leu | Tyr | Gln | Lys | Ile | Asp | Leu | Phe | Cys | Phe | Thr | Leu | Ser | Val | Pro | Ile |
| | | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | |
| 40 | Ser | Ala | Phe | Gln | Tyr | Ile | Ser | Leu | Val | Ile | Thr | Ser | Ile | Ile | Cys | Pro |
| | 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | 400 | |
| 45 | Val | Leu | His | Ile | Pro | Leu | Val | Thr | Gln | Leu | Phe | Met | Leu | Leu | Pro | Thr |
| | | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | |
| 50 | Leu | Val | Cys | Tyr | Phe | Ser | Gln | Ser | Leu | Val | Asp | Thr | Val | Phe | His | Leu |
| | | | | 420 | | | | | | | 425 | | | 430 | | |
| 55 | Thr | Asn | Gly | Met | Lys | Phe | Leu | Asp | Leu | Leu | Ile | Tyr | Glu | Val | Glu | Ser |
| | | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | |
| 60 | Met | Leu | Leu | Tyr | Gly | Ser | Phe | Tyr | Phe | Ile | Thr | Ile | Lys | Ser | Thr | Val |
| | | 450 | | | | | 455 | | | | | | 460 | | | |
| 65 | Leu | Ala | Leu | Met | Asn | Lys | Pro | Ala | Lys | Phe | Ile | Val | Thr | Pro | Lys | Val |
| | 465 | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | 480 | |
| 70 | Asn | Glu | His | Ile | Thr | Phe | Leu | His | Ala | Ile | Arg | Asn | His | Tyr | Gln | Gly |
| | | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | 495 | |

ES 2 315 038 A1

Ile Leu Phe Ser Ile Phe Thr Ile Ile Ala Cys Ile Ala Ile Ser Gly
500 505 510

5 Ser Tyr Trp Val Leu Leu Ser Phe Ile Pro Gly Cys Phe Gly Phe Leu
515 520 525

10 Phe Glu Met Gln Ala Asn His Arg Thr Ser Glu Glu Gln Ile Lys Ala
530 535 540

15 Asp Lys Leu Gln Ser Tyr Asn Asn Lys Ala Leu Gln Ser Gly Asn Thr
545 550 555 560

20 Glu Thr Val Asp Trp Asn Asp
565

<210> 7

25 <211> 25

<212> DNA

<213> Secuencia utilizada como cebador en experimentos de amplificación

30 <220>

<223> Oligonucleótido V

<400> 7

35 ttgccagaac tagagaaagt acgca

25

<210> 8

<211> 25

40 <212> DNA

<213> Secuencia utilizada como cebador en experimentos de amplificación

<220>

45 <223> Oligonucleótido VI

<400> 8

acttctatt ttagctaaaa agcaa

25

50

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

55 <213> *Artificial sequence*

<220>

<223> Oligonucleótido GTF-F

60

<400> 9

cggtaatgaa gcgtttcctg

20

65 <210> 10

<211> 18

ES 2 315 038 A1

| | | |
|----|---|----|
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia utilizada como cebador en experimentos de amplificación | |
| 5 | <220> | |
| | <223> Oligonucleótido GTF-R | |
| | <400> 10 | |
| 10 | gctagtagcgg tagacttg | 18 |
| | <210> 11 | |
| | <211> 22 | |
| 15 | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia utilizada como cebador en experimentos de amplificación | |
| | <220> | |
| 20 | <223> Oligonucleótido VII | |
| | <400> 11 | |
| 25 | tctcatcaag atgaacaatt gc | 22 |
| | <210> 12 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> DNA | |
| 30 | <213> Secuencia utilizada como cebador en experimentos de amplificación | |
| | <220> | |
| 35 | <223> Oligonucleótido VIII | |
| | <400> 12 | |
| 40 | acgccctgcg tggtatcata | 20 |
| | <210> 13 | |
| | <211> 23 | |
| | <212> DNA | |
| 45 | <213> Secuencia utilizada como cebador en experimentos de amplificación | |
| | <220> | |
| | <223> Oligonucleótido IX | |
| 50 | <400> 13 | |
| 55 | caacaagcca aggacgacga cca | 23 |
| | <210> 14 | |
| | <211> 24 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia utilizada como cebador en experimentos de amplificación | |
| 60 | <220> | |
| | <223> Oligonucleótido X | |
| 65 | <400> 14 | |
| | tctagaaatt aaaggaatgt gtaa | 24 |

ES 2 315 038 A1

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

5 <213> Secuencia utilizada como cebador en experimentos de amplificación

<220>

<223> Oligonucleótido XI

10

<400> 15

tctagattaa tcattccaat caactg

26

15 <210> 16

<211> 1701

<212> DNA

<213> *Pediococcus dammosus*

20

<400> 16

atgttaa atg ata atg attc aga act aaaa aa attt cact t gttt cattc taa acc agtc 60

25

ttt gt acc ag tt attt tta at t attt gg ttg ttt att at gt gctt at at ga at attt aa ca 120

tac ac ag ata gc at actt cc t attt tag ct aaaa ag ca ac cact aga agt a attt tac ct 180

30

at att ca at c a att attt gt ggc actt ttc tttt t gctt g ga at a act aa tatt att at c 240

gct at cc gct at g ca at gat taa ag a caaaa g caaaa aga at cc ga act agc a at act cg ca 300

35

aa ag aaa ac gc ct gc ag act g gc acc ct aaa gtt gag tt at t gt at ac g ac ct at a at gat 360

ttt at ac ct at gc act ag c t ca at g ttt a aa ac ag ac at g at a ac ac gc ag ggc gtt 420

40

at tttt gg ata act ct ac aga ccc caa at ac at ca ag at ga tt gat gat tt t gt gat ag cc 480

cat cct a at g taa ag tt agt c ag ag att ct caaaa ca agc at g ct aaa agc tgg aaa ct ta 540

45

a ca att att tgt g ta at gg cact ca t g ac tac g att act tt gtt at cct ag at ag cg at 600

ga att att ag aaa at ag att t g tag aaaaa t gttt aa aga t gttt tatta ca at gat att 660

ggc att cttc agt g ta at ca catt agt gga caaaa acc aca attc gttt at gc g tactt tc 720

50

tct agt tct g g ca at attt t tt gg cc agt g caaaa c gtt g tac ga agc gt t ga aggt ggc 780

tgg tt aa ata aa act gt gtc tgg cg ttt ct g tag g caaaa ct gg aggt g c att at gt att 840

55

ga att aggt c at gg cg t cat g attt c ac gt ga at g cttt g a ag at att g g a caa at acc c 900

tat gc ggt g g ca ga ag ac ct tt g tactt ct att ga ag ct a cact aaa ag g ct g ga ac att 960

60

aa attt g ctt ca caa attt a cg g ta at gaa gc gttt cct g tta at at ggc ag cat ta at g 1020

att ag at cta g ta ag tttt g tt ct g caa at ttt ga attt t tta aaaa ata ttc ggc gaga 1080

65

at cat ca agt caa ag ac cat a agt ct ct at caaaaa at cg actt gttt g tttt acc cta 1140

ES 2 315 038 A1

tcagttccaa taagtgcttt tcaatatatt agcttagtta ttactagtat aatttgtcca 1200
gtgttgcaca ttccactagt aacacaatta tttatgttat taccaacggt agtctgttac 1260
5 tttagtcaaa gtttggtcga tactgtcttt catttgacaa acggtatgaa attcttagat 1320
ttattgattt atgaagtaga atcaatggtg ttatatgggt ctttttattt tattacaatc 1380
10 aagtctaccg tactagcttt aatgaacaaa cctgctaaat tcatagttac accgaagggt 1440
aatgagcata taacttttct gcatgcaata agaaatcatt atcaaggaat cttattttca 1500
15 atatttacia taattgcatg tatcgcaatt tctggaaggt attgggtatt attatcattt 1560
attccggggt gttttgggtt tttgttcgaa atgcaagcta atcatcggac atcagaagaa 1620
20 caaataaaaag cggataaatt acagagttac aacaataagg cattacaatc tggcaacacg 1680
gaaacagttg attggaatga t 1701

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 315 038

② Nº de solicitud: 200402176

③ Fecha de presentación de la solicitud: 11.09.2004

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| X | DELAHERCHE, A., CLAISSE, O., LONVAUD-FUNEL, A. Detection and quantification of Brettanomyces bruxellensis and "ropy" <i>Pediococcus damnosus</i> strains in wine by real-time polymerase chain reaction. <i>Journal of Applied Microbiology</i> . Noviembre 2004, Vol. 97, Nº 5, páginas 910-915. ISSN 1364-5072. [En línea], [publicado en internet el 28.07.2004], [recuperado el 18.02.2009]. Recuperado de internet: <http://poa8.csic.papi.rediris.es/www3/cgi-bin/fulltext/118807256/PDFSTART> <DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02334.x> | 1 |
| A | | 2-9,12,13 |
| X | WALLING, E., GINDREAU, E., LONVAUD-FUNEL, A. La biosynthèse d'exopolysaccharide par des souches de <i>Pediococcus damnosus</i> isolées du vin: mise au point d'outils moléculaires de détection. <i>Lait</i> . Enero-abril 2001, Vol. 81, Nº 1-2, paginas 289-300. ISSN 0023-7302. | 1 |
| A | | 2-10,12,13 |
| A | GINDREAU, E., WALLING, E., LONVAUD-FUNEL, A. Direct polymerase chain reaction detection of ropy <i>Pediococcus damnosus</i> strains in wine. <i>Journal of Applied Microbiology</i> . Abril 2001, Vol. 90, Nº 4, páginas 535-542. ISSN 1364-5072 | 1,4-6,8,9,12,13 |
| A | MARTENSSON, O., STAAF, M., DUEÑAS-CHASCO, M. et al. A fermented, ropy, non-dairy oat product based on the exopolysaccharide-producing strain <i>Pediococcus damnosus</i> . <i>Advances in Food Sciences</i> . 2002, Vol. 24, Nº 1, páginas 4-11. ISSN 1431-7737. | 9,11 |

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
18.02.2009

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/1