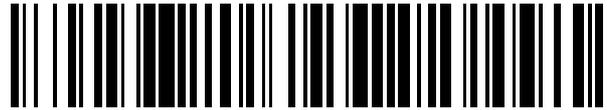


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 455**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2010 E 10779483 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2483423**

54 Título: **Método de autenticación de productos lácteos**

30 Prioridad:

**01.10.2009 EP 09172008**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.03.2016**

73 Titular/es:

**AGROSCOPE LIEBEFELD-POSIEUX ALP  
(100.0%)  
Schwarzenburgstrasse 161  
3003 Bern, CH**

72 Inventor/es:

**BERTHOUD, HÉLÈNE**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 564 455 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método de autenticación de productos lácteos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para establecer la autenticidad y el origen de productos lácteos, más específicamente al uso de cepas bacterianas acidolácticas que tienen elementos de secuencia de inserción localizados de forma exclusiva como herramientas para la fabricación de productos lácteos (tales como queso) y la identificación de los mismos. La invención también se refiere a aislados de bacterias acidolácticas, su uso en la producción de productos lácteos, así como los productos lácteos que contienen estas cepas bacterianas.

**Antecedentes**

15 La protección de artículos valiosos, productos y marcas siempre ha sido un requisito clave de los mercados actuales. En vista del aumento constante en la distribución falsificada y no autorizada de productos alimenticios existe la necesidad de soluciones eficaces para la autenticación de productos y artículos. Los ingredientes de un producto falsificado pueden ser diferentes, pero también pueden ser iguales, que los del producto genuino (pero en forma adulterada o de inferior calidad), que hace difícil la diferenciación.

20 Los esfuerzos existentes para autenticar productos incluyen, por ejemplo, la adición de marcadores exógenos de molécula pequeña, tales como vitaminas (por ejemplo, documento US 2006/0035288), sacáridos (por ejemplo, documento WO 2008/002987), marcadores visualmente detectables, por ejemplo, por fluorescencia, usando colorantes (por ejemplo, documento US 6.312.958, documento US 2004/0029295, documento EP 0 327 163, documento US 4.764.290), indicadores basados en heterociclos que contienen nitrógeno y/o azufre (por ejemplo, documento WO 2009/040563), o ácidos nucleicos (por ejemplo, documento WO 96/17954). Otros enfoques incluyen la identificación de indicadores geográficamente dependientes (por ejemplo, distribución de isótopos) e indicadores influenciados por el procesamiento (por ejemplo, contenido de cobre) (Pillonel et al., Mitt. Lebensm. Hyg. 95, 503 (2004) y referencias en el mismo), o la identificación de marcadores genéticos usando métodos de PCR, tales como elementos genéticamente móviles incluyendo elementos de secuencia de inserción (o elementos IS).

35 Los elementos IS bacterianos se descubrieron durante las primeras investigaciones sobre la expresión génica en *Escherichia coli* y el bacteriófago lambda. Varían de 800 a 2.500 pb de longitud y pueden encontrarse en el genoma de muchas bacterias diferentes en cantidades que varían entre unas pocas y unos pocos cientos de copias por genoma.

40 La estructura de los elementos IS se caracteriza normalmente por la presencia de secuencias repetidas invertidas en sus extremos y un gen que codifica una transposasa. Son capaces de insertarse en múltiples sitios en el genoma o en plásmidos (Mahillon et al. 1998). IS ha demostrado promover la adaptación evolutiva de los hospedadores (Nicoloff et al. 2003 y 2007, Papadopoulos et al. 1999, Schneider et al. 2004). Sin embargo, diversos elementos IS han demostrado diferentes actividades de transposición (Papadopoulos et al. 1999, Polzin et al. 1993). El polimorfismo de longitud de fragmento de restricción asociado a la presencia de múltiples elementos IS demostró ser adecuado para tipificar cepas de bacterias acidolácticas a nivel infra-especie (Petrovic et al. 2006, Ricci et al. 2006).

45 Los solicitantes han descubierto que elementos IS altamente variables que existen en localizaciones únicas en cepas bacterianas acidolácticas individuales pueden usarse como marcadores específicos de cepa para la fabricación de productos lácteos como una herramienta rápida y eficaz para su autenticación.

**Sumario de la invención**

50 Por consiguiente, la presente descripción se refiere, en general, a un nuevo método para establecer la autenticidad y origen de productos lácteos y más específicamente al uso de cepas bacterianas acidolácticas que tienen elementos IS localizados de forma exclusiva como herramientas para la fabricación de productos lácteos para su identificación.

55 La presente invención se define por las reivindicaciones 1-8.

60 Por tanto, la presente invención se refiere, en un primer aspecto descrito en este documento, a un método para identificar la presencia o la ausencia de una cepa bacteriana acidoláctica que comprende elementos IS localizados de forma exclusiva en un producto lácteo, que comprende detectar la presencia o ausencia de dicho elemento IS en un locus particular en el genoma.

Más específicamente, el método comprende las etapas de (a) obtener una muestra de ácido nucleico de un producto lácteo, (b) proporcionar un par de cebadores específicos para una región de dicho elemento IS localizado de forma exclusiva y una región de una secuencia de ácido nucleico adyacente a dicho elemento IS localizado de forma exclusiva, (c) realizar una reacción de amplificación por PCR con dicho par de cebadores de la etapa en condiciones adecuadas para producir un producto de amplificación cuando dicho elemento IS localizado de forma exclusiva está

presente en dicha muestra de ácido nucleico, y (d) identificar la presencia o ausencia de una cepa bacteriana acidoláctica detectando la presencia o ausencia de dicho producto de amplificación.

5 En realizaciones específicas, la cepa bacteriana acidoláctica que comprende un elemento IS localizado de forma exclusiva, a partir de ahora en este documento también llamada cepa marcadora (de la invención), se selecciona entre el grupo que consiste en *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus thermophilus*, preferiblemente *Pediococcus*, tal como la depositada el 25 de septiembre de 2009 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con el número de acceso DSM 22981, y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *lactis*, tal como la depositada el 28 de septiembre de 2010 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con el número de acceso DSM 24025.

15 En un aspecto adicional, se describen pares de cebadores específicos adecuados para su uso en los métodos, consistiendo cada uno en un primer cebador y un segundo cebador entre 10 y 100, preferiblemente 18 y 35 nucleótidos de longitud, que son suficientemente específicos para un fragmento de un elemento IS presente en una cepa bacteriana acidoláctica particular definida anteriormente y un fragmento de la secuencia adyacente a dicho elemento IS, respectivamente, para permitir la amplificación por PCR.

En un aspecto adicional, la descripción también se refiere al uso de dichos cebadores o pares de cebadores

20 Se describen adicionalmente nuevos aislados de bacterias acidolácticas, tales como *Pediococcus acidilactici* representada por el aislado depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con el número de acceso DSM 22981, y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *lactis* representada por el aislado depositado el 28 de septiembre de 2010 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con el número de acceso DSM 24025. Se incluyen un mutante o variante de las mismas, o una bacteria que tenga al menos un 93 por ciento de similitud de secuencia con el ARNr 16S con cada una de las cepas anteriores.

30 En un aspecto adicional, la descripción también se refiere a un producto lácteo, preferiblemente queso, que comprende la cepa bacteriana acidoláctica descrita anteriormente o una combinación de las cepas bacterianas acidolácticas descritas.

35 En un aspecto adicional, se describe en ese documento el uso de una cepa bacteriana acidoláctica que comprende elementos IS localizados de forma exclusiva para la identificación y certificado de origen de un producto lácteo, donde el certificado de origen se indica por la presencia de dicha cepa bacteriana acidoláctica.

40 En un aspecto adicional, la presente descripción también se refiere a un kit para la detección específica de una cepa bacteriana acidoláctica que comprende elementos IS localizados de forma exclusiva, que comprende un par de cebadores identificados anteriormente en este documento para la identificación y certificado de origen de un producto lácteo, donde el certificado de origen se indica por la presencia de dicha cepa bacteriana acidoláctica.

#### Descripción detallada de la invención

45 Debe entenderse que el uso de "uno" o "una" con respecto a cepas y elementos IS incluye una o más cepas o uno o más elementos IS. Por tanto, se incluyen también combinaciones de una cepa bacteriana acidoláctica que tiene una o más secuencias marcadoras, dos o más cepas bacterianas acidolácticas que tienen, cada una, una secuencia marcadora, y dos o más cepas bacterianas acidolácticas que tienen, cada una, dos o más secuencias marcadoras. Se analizan en el texto combinaciones específicas.

50 La expresión "variante" o "derivado" de una cepa como se usa en este documento significa una cepa que difiere de otra cepa (relacionada) de un modo específico o inespecífico pero que comparte la misma secuencia marcadora. Pueden aparecer variantes a través de mutación espontánea o pueden prepararse de forma intencionada por manipulación genética o medios convencionales incluyendo mutación por fuentes de luz ultravioleta, mediante el uso de agentes químicos tales como nitrosoguanidina y similares.

55 La expresión "variante" o "derivado" con respecto a secuencias marcadoras de nucleótidos incluyen todas las secuencias de nucleótidos que difieren por sustitución, delección, adición de algunos nucleótidos, pero que dan un producto de PCR de un tamaño similar (menos de un 15 % de diferencia de pb) con cebadores descritos en este documento.

60 El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido monocatenario capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN dirigida por molde en condiciones apropiadas (es decir, en presencia de cuatro nucleósido trifosfatos diferentes y una ADN polimerasa) en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. La longitud apropiada de un cebador depende del uso pretendido del cebador, pero es habitualmente suficiente para proporcionar hibridación en las condiciones deseadas, y es habitualmente entre 18 y 35 nucleótidos de longitud.

65 Moléculas cebadoras cortas generalmente requieren temperaturas más frías para formar complejos híbridos suficientemente estables con el molde. Un cebador no tiene que reflejar la secuencia exacta del molde, sino debe

ser suficientemente complementario para hibridar con un molde. La expresión "sitio de cebador" se refiere al área del ADN diana con el cual hibrida un cebador. La expresión "par de cebadores" significa un conjunto de cebadores que incluye un "cebador cadena arriba" 5' que hibrida con el extremo 5' de la secuencia de ADN a amplificar y un "cebador cadena abajo" 3' que hibrida con el complemento del extremo 3' de la secuencia a amplificar. Se diseñan específicamente pares de cebadores adecuados en este documento para detectar un elemento IS localizado de forma exclusiva y comprende un primer cebador que hibrida con un fragmento dentro del elemento IS y un segundo cebador que hibrida con un fragmento que está flanqueando el elemento IS. Dentro del presente contexto, la secuencia abarcada por el primer y segundo cebador también se menciona como secuencia marcadora.

El término "complemento", "complementario" o "complementariedad", como se usa en este documento, con referencia a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos tal como un oligonucleótido o un ácido nucleico diana) se refiere a normas de apareamiento convencional de Watson/Crick. El complemento de una secuencia de ácido nucleico de modo que el extremo 5' de una secuencia esté apareado con el extremo 3' de la otra, es en "asociación antiparalela".

La expresión "complementariedad sustancial" significa que una secuencia, en este documento un cebador o una sonda, no tiene que ser exactamente complementaria a su secuencia diana; en su lugar, el cebador o sonda tiene que ser solo suficientemente complementaria para hibridar selectivamente con su hebra respectiva en el sitio de hibridación deseado. Los expertos en la materia entenderán que secuencias sustancialmente complementarias no tienen que hibridar a lo largo de su longitud completa. Puede incluirse una base o múltiples bases no complementarias dentro del cebador o sonda, siempre que el cebador o sonda retenga suficiente complementariedad con su sitio de unión al polinucleótido para formar un dúplex estable con el mismo.

"Hibridación específica" de cebadores es el apareamiento a la secuencia complementaria formando un polinucleótido bicatenario, que proporciona un sitio de inicio para la extensión de cebador y la síntesis de ADN.

El término "amplicón" o "producto de amplificación" se refiere al producto de la reacción de amplificación generado a través de la extensión de un par de cebadores. Un amplicón puede contener ácidos nucleicos amplificados de forma exponencial si ambos cebadores utilizados hibridan con una secuencia diana. Como alternativa, pueden generarse amplicones por amplificación lineal si uno de los cebadores utilizados no hibrida con la secuencia diana. Un método preferido de amplificación utiliza PCR (véase, Saiki et al. (1988) Science 239:487-4391). El método utiliza un par de cebadores como se ha descrito anteriormente. En PCR convencional, los cebadores se mezclan con un tampón apropiado que contiene  $Mg^{2+}$ , los cuatro desoxinucleótidos (dNTP), una ADN polimerasa termoestable y el ADN diana (el molde). La mezcla después se calienta hasta una temperatura suficiente para separar las dos hebras complementarias de ADN. La mezcla a continuación se enfría hasta una temperatura suficiente para permitir que los cebadores hibriden específicamente con secuencias complementarias. La temperatura de la mezcla de reacción después se reajusta opcionalmente a la óptima para la ADN polimerasa termoestable para permitir que continúe la síntesis de ADN (extensión). El régimen de temperatura después se repite para constituir cada ciclo de amplificación. Por tanto, la PCR consiste en múltiples ciclos de fusión, hibridación y extensión de ADN. Los métodos de PCR usados en los métodos de presente invención se realizan usando métodos convencionales (véase, por ejemplo, McPherson et al., PCR (Basics: From Background to Bench) (2000) Springer Verlag; Dieffenbach y Dveksler (eds) PCR Primer: A Laboratory Manual (1995) Cold Spring Harbor Laboratory Press; Erlich, PCR Technology, Stockton Press, Nueva York, 1989; Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Harcourt Brace Javanovich, Nueva York, 1990; Barnes, W. M. (1994) Proc Natl Acad Sci U S A, 91, 2216-2220). Los cebadores u oligonucleótidos usados en los métodos descritos en este documento son preferiblemente ADN. Dentro del presente contexto, el producto de amplificación o amplicón se obtiene realizando una reacción de amplificación por PCR usando un par de cebadores descritos en este documento, amplificando de ese modo la secuencia marcadora (es decir, la secuencia abarcada por el primer y segundo cebador) y obteniendo el correspondiente producto de amplificación o amplicón.

Como se usa en este documento, el término "detectar" usado en el contexto de la detección de la presencia de una secuencia de ácido nucleico diana, para indicar la presencia de una cepa específica en una muestra, etc. no requiere que el método proporcione sensibilidad del 100 % y/o especificidad del 100 %. Como es bien sabido, "sensibilidad" es la probabilidad de que un ensayo sea positivo, dado que una muestra tiene una secuencia de ácido nucleico diana, mientras que "especificidad" es la probabilidad de que un ensayo sea negativo, dado que la muestra no tiene la secuencia de ácido nucleico diana. Se prefiere una sensibilidad de la menos el 50 %, aunque son claramente más preferidas sensibilidades de al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % y al menos el 99 %. Se prefiere una especificidad de al menos el 50 %, aunque son claramente más preferidas especificidades de al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % y al menos el 99 %. La detección también abarca ensayos con falsos positivos y falsos negativos. Las tasas de falso negativo pueden ser del 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o incluso mayores. Las tasas de falso positivo pueden ser del 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o incluso mayores.

Un "fragmento", con respecto a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, un fragmento con un elemento IS o un fragmento dentro de la secuencia de ácido nucleico que flanquea el elemento IS, que sirve como sitio de hibridación del par de cebadores descrito en este documento), se refiere a una secuencia de restos nucleotídicos

entre 15 y 2.000 pb, preferiblemente entre 15 y 500, más preferiblemente entre 50 y 400, mucho más preferiblemente entre 100 y 300 nucleótidos de longitud.

5 La presente invención se refiere, en general, a un método de autenticación y certificado de origen de productos lácteos marcando los productos lácteos durante la producción con cepas bacterianas acidolácticas que tienen elementos IS localizados de forma exclusiva, a partir de ahora en este documento también llamadas cepas marcadoras (de la invención). La detección de estas cepas que tienen elementos IS localizados de forma exclusiva permitirá establecer el certificado de origen de un producto lácteo.

10 Por tanto, la presente invención se refiere a un método para identificar la presencia o ausencia de una cepa bacteriana acidoláctica que comprende un elemento IS localizado de forma exclusiva en un producto lácteo, que comprende detectar la presencia o ausencia de dicho elemento IS en un locus particular, donde su presencia identifica la presencia de una cepa bacteriana acidoláctica en dicho producto lácteo. Más específicamente, el método comprende las etapas de

- 15 (a) obtener una muestra de ácido nucleico de un producto lácteo,
- (b) proporcionar un par de cebadores específicos para una región de dicho elemento IS localizado de forma exclusiva, y una región de una secuencia de ácido nucleico adyacente a dicho elemento IS localizado de forma exclusiva,
- 20 (c) realizar una reacción de amplificación por PCR con dicho par de cebadores de la etapa (b) en condiciones adecuadas para producir un producto de amplificación cuando dicho elemento IS localizado de forma exclusiva está presente en dicha muestra de ácido nucleico, y
- 25 (d) identificar la presencia o la ausencia de una cepa bacteriana acidoláctica detectando la presencia o ausencia de dicho producto de amplificación.

30 En realizaciones específicas, la cepa bacteriana acidoláctica usada en los métodos de la invención puede ser cualquier tipo de bacteria láctica presente en productos lácteos o usada en la industria láctea, por ejemplo, *Lactococci* tales como *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*, *Lactococcus lactis* subespecie *cremoris* y *Lactococcus lactis* subespecie *lactic* biovar *diacetylactis*; *Pediococci* tales como *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*; *Streptococci* tales como *Streptococcus thermophilus*; *Lactobacilli* tales como *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *lactis*,  
 35 *Lactobacillus rhamnosus*.

Una cepa preferida de la invención es una depositada el 25 de septiembre de 2009 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con el número de acceso DSM 22981.

40 Otra cepa útil es la depositada el 28 de septiembre de 2010 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con el número de acceso DSM 24025.

45 Preferiblemente, el elemento IS localizado de forma exclusiva es al menos un 75 % idéntico a un elemento IS seleccionado entre el grupo que consiste en elementos IS fácilmente disponibles de bacterias acidolácticas *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus damnosus* y *Lactobacillus rhamnosus* incluyendo, aunque sin limitación, la secuencia IS30, IS153, ISS1, IS981, IS1076, ISL1, ISLP11, IS904, e IS946 o parte de las mismas.

50 Las muestras de ácido nucleico del producto lácteo (de acuerdo con la etapa (a) del método anterior) pueden extraerse por métodos conocidos en la técnica.

55 Los métodos comprenden detectar una o más cepas bacterianas acidolácticas que comprenden cada una un elemento IS localizado de forma exclusiva. La detección incluye hibridar una muestra de ácido nucleico con un par de cebadores de la invención para cada cepa, permitir que suceda la amplificación y obtener un producto de amplificación para cada cepa. Preferiblemente, el método incluye detectar una cepa o una combinación de 2 o 3 cepas.

60 Como alternativa, los métodos comprenden detectar una cepa bacteriana acidoláctica que comprende hasta uno o más elementos IS localizados de forma exclusiva, que puede conseguirse hibridando una muestra de ácido nucleico con un par de cebadores de la invención para cada elemento IS, permitiendo que suceda la amplificación y obteniendo un producto de amplificación para cada elemento IS. Preferiblemente, el método incluye detectar 1, 2 o 3 elementos IS.

65 La identificación de uno o más elementos IS localizados de forma exclusiva en una cepa específica se consigue por (i) detección en primer lugar de uno o más elementos IS en una cepa específica usando cebadores apropiados, (ii)

amplificación posterior del ADN entre el uno o más IS diferentes detectados en una cepa específica así como en otras cepas de la misma especie usando cebadores específicamente diseñados en solitario o en diferentes combinaciones, y (iii) detección de productos de PCR únicos para la cepa específica. Los productos de PCR únicos identificados se secuencian, se diseñan los cebadores y se evalúa la especificidad de la cepa.

5 Las muestras de ácido nucleico del producto lácteo pueden amplificarse usando un par de cebadores descritos en este documento usando diversos métodos conocidos para los expertos en la materia. Preferiblemente, se usa PCR para amplificar ácidos nucleicos de interés. En resumen, se adquieren dos secuencias cebadoras que son complementarias a regiones en hebras complementarias opuestas como se describe en ese documento, es decir, un primer cebador hibrida con un fragmento de un elemento IS localizado de forma exclusiva y un segundo cebador hibrida con un fragmento de la secuencia de ácido nucleico adyacente a dicho elemento IS. Se añade un exceso de oligonucleótidos a una mezcla de reacción junto con una ADN polimerasa, por ejemplo, polimerasa Taq y desoxinucleótido trifosfatos.

15 Si el elemento IS localizado de forma exclusiva está presente en una muestra, los cebadores se unirán a su secuencia complementaria dentro del elemento IS y su secuencia flanqueante y la polimerasa causará que los cebadores se extiendan a lo largo de la secuencia marcadora añadiendo nucleótidos. Elevando y bajando la temperatura de la mezcla de reacción, los cebadores extendidos se disociarán del marcador para formar productos de reacción, un exceso de cebadores se unirá a la secuencia diana y los productos de reacción y el proceso se repite, generando de ese modo productos de amplificación exponencial. Los parámetros de ciclado pueden variarse, dependiendo de la longitud de los productos de amplificación a extender. Puede incluirse un control de amplificación positivo interno (IPC) en la muestra, utilizando cebadores específicos, por ejemplo, para controlar tanto la extracción de ADN como cualquier amplificación posterior.

25 En particular, se realiza PCR a tiempo real usando cualquier instrumento adecuado capaz de detectar la acumulación del producto de amplificación de PCR. Más habitualmente, el instrumento es capaz de detectar fluorescencia de uno o más marcadores fluorescentes. Por ejemplo, la detección a tiempo real del instrumento (por ejemplo, un Rotorgene) controla la fluorescencia durante cada ciclo de PCR. El ciclo umbral, o valor Ct, es el ciclo al cual la fluorescencia cruza el valor umbral. El valor umbral se determina por software o manualmente.

30 Una amplificación de una secuencia de ácido nucleico puede detectarse por cualquiera de varios métodos bien conocidos en la técnica tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar o detección "a tiempo real".

35 Por ejemplo, se amplifican secuencias de dos o más fragmentos de interés en el mismo recipiente de reacción (es decir, "PCR combinada"). La detección puede tener lugar midiendo el punto final de la reacción o en "tiempo real".

40 Para detección a tiempo real, pueden marcarse de forma detectable cebadores y/o sondas para permitir diferencias en la fluorescencia cuando los cebadores quedan incorporados o cuando las sondas se hibridan, por ejemplo, y amplifican en un instrumento capaz de controlar el cambio en la fluorescencia durante la reacción. Los métodos de detección a tiempo real para amplificación de ácido nucleico son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, el sistema TaqMan®, el sistema de cebadores Scorpion™ y el uso de colorantes intercalantes para ácido nucleico bicatenario. Los marcadores útiles incluyen, por ejemplo, colorantes fluorescentes (por ejemplo, rojo Texas, FAM, JOE, HEX).

45 En la detección de punto final, podría detectarse el amplicón o amplicones separando primero por tamaño los amplicones, después detectando los amplicones separados por tamaño. La separación de amplicones de diferentes tamaños puede conseguirse por, por ejemplo, electroforesis en gel o electroforesis capilar. Estos y otros métodos de separación son bien conocidos en la técnica. En un ejemplo, pueden separarse amplicones de aproximadamente 10 a aproximadamente 150 pares de bases cuyos tamaños difieren en 10 o más pares de bases, por ejemplo, en un gel de agarosa del 4 % al 5 % (un gel de agarosa del 2 % al 3 % para amplicones de aproximadamente 150 a aproximadamente 300 pares de bases), o un gel de poliacrilamida del 6 % al 11 %. Los ácidos nucleicos separados después pueden teñirse con un colorante tal como GelRed y el tamaño de la banda o bandas teñidas resultantes puede compararse con un DNA ladder convencional.

55 Por tanto, en un ejemplo específico del método, la presencia del producto de amplificación se indica identificando el tamaño (longitud de ADN) de la secuencia amplificada, por electroforesis en gel, mediante cebadores marcados usados para reacción en cadena de la polimerasa, incorporándose dichos cebadores en las secuencias amplificadas, o mediante una sonda de ADN marcada para hibridar con una parte única de la secuencia amplificada seguido por análisis de transferencia de Southern.

60 Se describe adicionalmente uno o más pares de cebadores usados para la hibridación y amplificación de acuerdo con los métodos descritos en este documento, más específicamente un par de cebadores que comprende un primer cebador y un segundo cebador que comprenden cada uno al menos 15 nucleótidos contiguos, donde el primer cebador es suficientemente específico para una secuencia dentro de un elemento de inserción localizado de forma exclusiva, y el segundo cebador suficientemente específico para una secuencia dentro de la región flanqueante del elemento de inserción. Más preferiblemente, el par de cebadores comprende un primer cebador de la SEC ID N.º 1 y un segundo cebador de la SEC ID N.º 2 para identificar la presencia o ausencia de una cepa *Pediococcus* en un

producto lácteo, o un sexto cebador de la SEC ID N.º 6 y un séptimo cebador de la SEC ID N.º 7 para identificar la presencia o ausencia de una cepa *Lactobacillus* en un producto lácteo, o una combinación de los mismos.

5 El método para identificar la presencia o ausencia de una cepa *Pediococcus acidilactii* en un producto lácteo comprende las etapas de

(a) obtener una muestra de ácido nucleico de un producto lácteo,

10 (b) proporcionar un par de cebadores específicos para una región de ISS1SC (n.º de acceso a GenBank X94934), y una región de una secuencia de ácido nucleico adyacente a dicho elemento IS localizado de forma exclusiva, preferiblemente un par de cebadores donde un primer cebador del par de cebadores comprende la secuencia de la SEC ID N.º 1, y un segundo cebador del par de cebadores comprende la secuencia de la SEC ID N.º 2

15 (c) realizar una reacción de amplificación por PCR con el par de cebadores de la etapa (b) en condiciones adecuadas para permitir que suceda la hibridación del primer y segundo cebador, y

20 (d) detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación como indicación de la presencia o ausencia de dicha cepa *Pediococcus*.

En un ejemplo adicional más, el método para identificar la presencia o ausencia de una cepa *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *lactis* en un producto lácteo comprende las etapas de

(a) obtener una muestra de ácido nucleico de un producto lácteo,

25 (b) proporcionar un par de cebadores específicos para una región de IS30 (n.º de acceso a GenBank NC\_008529), y una región de una secuencia de ácido nucleico adyacente a dicho elemento IS localizado de forma exclusiva, preferiblemente un par de cebadores donde un sexto cebador del par de cebadores comprende la secuencia de la SEC ID N.º 6, y un séptimo cebador del par de cebadores comprende la secuencia de la SEC ID N.º 7

30 (c) realizar una reacción de amplificación por PCR con el par de cebadores de la etapa (b) en condiciones adecuadas para permitir que suceda la hibridación del sexto y séptimo cebador, y

35 (d) detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación como una indicación de la presencia o ausencia de dicha cepa *Lactobacillus*.

Se entiende que los métodos anteriores pueden combinarse para identificar la presencia o ausencia de una cepa *Pediococcus* y *Lactobacillus* en un producto lácteo.

40 En un aspecto adicional más, la presente invención se refiere a una cepa bacteriana acidoláctica aislada *Pediococcus acidilactici* representada por el aislado depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) el 25 de septiembre de 2009 con el número de acceso DSM 22981. Se describe en este documento también un mutante o variante de la misma, o una bacteria que tiene la misma secuencia marcadora que dichas cepas, o la cepa bacteriana acidoláctica aislada *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *lactis* representada por el aislado depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) el 28 de septiembre de 2010 con el número de acceso DSM 24025, o un mutante o variante de la misma, o una bacteria que tenga la misma secuencia marcadora que dichas cepas.

50 La presente invención también describe un cultivo puro aislado, de las cepas bacterianas acidolácticas que tienen las características mencionadas anteriormente. Como se usa en este documento, la expresión "cultivo puro" indica que el cultivo contiene una biomasa de un único aislado de la cepa bacteriana acidoláctica de acuerdo con la invención, es decir, un clon originario en principio de una célula.

55 Dicho cultivo puro puede proporcionarse como una suspensión celular líquida o como una preparación congelada, secada por pulverización o secada por congelación. Preferiblemente, el cultivo puro es un concentrado de células obtenido por separación de células, por ejemplo, por centrifugación o filtración usando técnicas convencionales.

60 En un aspecto adicional más, se describe una composición de cultivo que comprende uno de los cultivos puros definidos anteriormente o cepas bacterianas acidolácticas, y un vehículo microbiológicamente aceptable.

65 La composición puede comprender dos o más de los cultivos puros definidos anteriormente o cepas bacterianas acidolácticas y puede comprender opcionalmente una especie bacteriana acidoláctica adicional tal como la seleccionada entre el grupo que consiste en especies de *Lactococcus*, especies de *Lactobacillus*, especies de *Leuconostoc*, especies de *Weissella*, especies de *Oenococcus*, de *Streptococcus* spp., una especie de *Bifidobacterium*, una especie de *Propionibacterium* o una especie de *Pediococcus* diferente a las definidas

anteriormente en este documento.

Combinaciones preferidas de cepas incluyen combinaciones de especies de *Lactobacillus* y/o *Pediococcus* y/o *Streptococcus*. Las composiciones de cultivo pueden ser un cultivo de partida o no de partida auxiliar, preferiblemente cultivo no de partida auxiliar.

Puede preferirse que dicha composición de cultivo contenga al menos una cepa marcadora a una concentración de 100-1000 ufc/ml de leche (para producción de queso). Las sustancias vehículo adecuadas incluyen nutrientes tales como una fuente asimilable de carbohidrato o nitrógeno, que puede utilizarse fácilmente por la cepa bacteriana acidoláctica. Normalmente, dicha composición se proporciona en forma de una composición congelada o secada por congelación. En el último caso, la composición puede contener compuestos crioprotectores.

Por tanto, en un aspecto adicional, la presente descripción se refiere al uso de la cepa bacteriana acidoláctica definida anteriormente o a un cultivo puro como cultivo de partida o un cultivo no de partida auxiliar o cultivo inactivado en la producción de un producto lácteo, preferiblemente queso. Se describe un método para producir un producto lácteo, tal como queso, añadiendo a la leche una cantidad eficaz de una cepa bacteriana acidoláctica o una composición.

Una cepa bacteriana adecuada se elige de modo que no afecte al proceso de preparación de queso y/o que no afecte a la calidad del queso, y/o que sobreviva a las condiciones del proceso de preparación de queso y/o que su detección sea posible en queso entero, queso rallado y/o corteza del queso para permitir el certificado de origen del queso que contiene dicha cepa bacteriana.

Como se usa en este documento, el término "leche" significa cualquier tipo de leche o componente lácteo fresco o reconstituido, desnatado, semi-desnatado o entero, leche pasteurizada incluyendo, por ejemplo, leche de vaca, leche de búfala, leche de cabra, leche de oveja que tiene un contenido de materia seca del 10 al 20 % en peso. El procesamiento de leche para obtener un producto lácteo tal como queso se realiza usando etapas de procesos convencionales.

Normalmente, la cepa bacteriana acidoláctica se añade a la leche a una concentración de células viables que es de al menos  $10^3$  UFC/g, preferiblemente en el intervalo de  $10^3$  a  $10^{13}$  UFC/g, tal como en el intervalo de  $10^5$  a  $10^9$  UFC/g, por ejemplo, en el intervalo de  $10^6$  a  $10^8$  UFC/g de leche. En un aspecto adicional, la presente descripción también se refiere a un producto lácteo, preferiblemente queso, que comprende una cepa bacteriana acidoláctica o cultivo puro o una composición de cultivo de la misma.

Por tanto, también se describe el uso de una cepa bacteriana acidoláctica o un cultivo puro de la misma o una composición de cultivo de la misma para la identificación de un producto lácteo, preferiblemente queso, y por tanto para un método de fabricación de un producto lácteo para la identificación y certificado de origen que comprende añadir a una composición de partida de queso, una cepa bacteriana acidoláctica o un cultivo puro de la misma o una composición de cultivo de la misma.

Se describe adicionalmente también un kit para la detección específica de una cepa bacteriana acidoláctica de la invención o un cultivo puro de la misma o una composición de cultivo de la misma que comprende un par de cebadores específico para una región de un elemento IS localizado de forma exclusiva dentro de dicha cepa bacteriana acidoláctica o cultivo puro o composición de cultivo de la misma y una región de una secuencia de ácido nucleico adyacente a dicho elemento IS localizado de forma exclusiva. Dicho kit puede usarse para la identificación y certificado de origen de un producto lácteo, donde el certificado de origen se indica por la presencia de una cepa bacteriana acidoláctica como se ha definido anteriormente en este documento que comprende un par de cebadores.

## 50 Ejemplos

**Materiales:** Las cepas/cultivos bacterianos usados incluyen cepas disponibles en el mercado así como la cepa *Pediococcus acidilactici* depositada el 25 de septiembre de 2009 y la cepa *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *lactis* depositada el 28 de septiembre de 2010 de conformidad a, y en satisfacción de, los requisitos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con Fines de Procedimiento de Patente en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con el número de acceso DSM 22981 y DSM 24025, respectivamente.

**Métodos:** Se extrajo el ADN de queso suspendiendo 10 g de queso rallado en agua de peptona (peptona al 1 %, NaCl al 0,5 % y citrato sódico al 2 %) y mezclando en un aparato Stomacher a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se mezclaron 10 ml de extracto de queso con 50 ml de SDS al 10 % y se centrifugaron 30 minutos a 4000 x g. El sobrenadante se descartó excepto aproximadamente 1 ml que se transfirió con el sedimento en un tubo de 1,5 ml. Después de centrifugación (5 minutos 10.000 x g) se descartó el sobrenadante y se suspendió el sedimento en 950 ml de TES (0,1 mol l<sup>-1</sup> Tris-HCl, 10 mmol l<sup>-1</sup> de EDTA, sacarosa al 25 % p/v, pH 8,0) y lisozima. El ADN se aisló con el kit EZ DNA Tissue (Qiagen) después de incubación con proteinasa K como se describe en las instrucciones del fabricante.

La amplificación se realizó con una mezcla de reacción de 25 µl que contenía 2,5 µl de tampón 10X con 15 mmol·l<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0,5 ml de 10 mmol·l<sup>-1</sup> de dNTP (Promega Corp., Madison, WI), 0,2-25 µl de cada cebador (100 mmol·l<sup>-1</sup>) (Operon Technologies, Alameda, CA o Microsynth Laboratory, Balgach, CH) y 0,2 - 0,25 µl de ADN polimerasa Taq (5 U·µl<sup>-1</sup> AmpliTaq Gold) (Applied Biosystems). La amplificación se realizó con un sistema de PCR GeneAmp (Applied Biosystems). Los productos de amplificación se separaron en un LabChip DNA 7500 o DNA 1000 en un Agilent 2100 Bioanalyser de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

#### 10 Ejemplo 1: Desarrollo de PCR específica de cepa

Para buscar una secuencia de inserción localizada de forma exclusiva, se amplificó el segmento de ADN entre el IS usando combinaciones de cebadores enfocados hacia afuera cadena arriba y cadena abajo. Se diseñaron para diferentes IS de bacterias acidolácticas.

15 (a) *Pediococcus acidilactici*:

El programa de amplificación incluyó una etapa de desnaturalización inicial de 10 minutos a 95 °C; 35 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 54 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 8 minutos; y una etapa de extensión final de 20 10 minutos a 72 °C.

Como ejemplo, el par de cebadores Z32771FOUT (5'-CGTTCGGAATAGGTTATACT; SEC ID N.º 3) diseñado sobre la región 9519-10424 de operones de sacarosa y rafinosa de *Pediococcus pentosaceus* (número de acceso Z32771) e ISSIPpROUT (5'-AGGCTGCTTGCATATC; SEC ID N.º 1) diseñado sobre el gen de transposasa de ISS1SC de *Streptococcus thermophilus* (número de acceso X94934) mostró un producto de PCR de 1700 pb solamente para la cepa *Pediococcus acidilactici* de la invención (número de acceso DSM 22981).

Este amplicón se secuenció con los cebadores enfocados hacia afuera de IS mencionados anteriormente y se diseñaron nuevos cebadores sobre la secuencia génica adyacente a IS. La PCR entre ISSIPpROUT (SEC ID N.º 1) y el nuevo cebador diseñado G27 (5'-ATCGTTCGAACGCCGCAAGAAAC; SEC ID N.º 2) mostró un producto de PCR de 220 pb solamente para la cepa *Pediococcus acidilactici* de la invención (número de acceso. DSM 22981).

(b) *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *lactis*

35 El programa de amplificación incluyó una etapa de desnaturalización inicial de 10 minutos a 95 °C; 35 ciclos de 95 °C durante 1 minuto, 59 °C durante 1 minuto, y 72 °C durante 3 minutos; y una etapa de extensión final de 7 minutos a 72 °C.

Como ejemplo, el par de cebadores c355a-3 (5'-GGTGCAACTCTTCTCCTCGAA; SEC ID N.º 4) diseñado sobre la transposasa de la familia IS30 de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* (número de acceso NC\_008529) y c370-3 (5'-GGAAGGGCAAGCAGGATT; SEC ID N.º 5) diseñado sobre el gen de transposasa de *Lactobacillus helveticus* (número de acceso NC\_010080) mostró un producto de PCR 1210 pb solamente para la cepa *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *lactis* de la invención (número de acceso. DSM 24025)

45 Este amplicón se secuenció con los cebadores enfocados hacia afuera de IS mencionados anteriormente y se diseñaron nuevos cebadores sobre la secuencia génica adyacente a IS. La PCR entre el nuevo cebador diseñado Lb102-F (5'-CTTAACTACAAGACTCCAGAAGAA; SEC ID N.º 6) sobre la transposasa de la familia IS30 de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* (número de acceso NC\_008529) y el nuevo cebador diseñador 19108/2010-17 (5'-GGCATCAATTTATAGACGCCAAT; SEQ ID N.º 7) mostró un producto de PCR de 136 pb solamente para la cepa *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *lactis* de la invención (número de acceso DSM 24025).

#### Ejemplo 2: Ensayo de especificidad de cepa

(a) *Pediococcus acidilactici*:

55 Los cebadores enfocados hacia afuera para ISS1SC de *Streptococcus thermophilus* usados con el cebador G27 amplifican la secuencia marcadora de la cepa *Pediococcus acidilactici* de la invención (número de acceso DSM 22981).

60 Para verificar la presencia de la secuencia marcadora exclusivamente en la cepa marcadora, se sometieron a detección de la secuencia marcadora 50 cepas relacionadas y 36 quesos producidos sin el cultivo marcador y 20 quesos producidos con el cultivo marcador. Los resultados mostraron que todas las cepas y todos los quesos producidos sin la secuencia marcadora eran negativos, pero todos los quesos producidos con el cultivo marcador eran positivos.

65 (b) *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *lactis*

Asimismo, se ensayaron más de 50 cepas diferentes de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *lactis*. Los resultados mostraron que, como se esperaba, todas las cepas ensayadas eran negativas. Solamente los quesos producidos con el cultivo marcador ensayado eran positivos.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Agroscope Liebefeld-Posieux ALP

10 <120> Método de autenticación

<130> P158406

15 <160> 7

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

20 <211> 16

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> oligonucleótido sintético

<400> 1

aggctgctg cgtatc 16

<210> 2

30 <211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35 <223> oligonucleótido sintético

<400> 2

atcgtcgaac gccgaagaa ac 22

<210> 3

40 <211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

45 <223> oligonucleótido sintético

<400> 3

50 cgttcggaat aggttact 20

<210> 4

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

55

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 4

60 ggtgcaactc tctcctcga a 21

<210> 5

<211> 18

<212> ADN

65 <213> Artificial

<220>

# ES 2 564 455 T3

<223> oligonucleótido sintético

5 <400> 5  
ggaagggcaa gcaggatt 18

<210> 6  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> oligonucleótido sintético

15 <400> 6  
ctaaactac aagactccag aagaa 25

<210> 7  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> oligonucleótido sintético

25 <400> 7  
ggcatcaatt tatagcgcc aat 23

REIVINDICACIONES

1. Método para identificar la presencia o la ausencia de una cepa bacteriana acidoláctica que comprende un elemento IS localizado de forma exclusiva en un producto lácteo, comprendiendo el método:
- 5
- (a) obtener una muestra de ácido nucleico de un producto lácteo,
  - (b) proporcionar un par de cebadores específicos para una región de dicho elemento IS localizado de forma exclusiva y una región de una secuencia de ácido nucleico adyacente a dicho elemento IS localizado de forma unívoca,
  - 10 (c) realizar una reacción de amplificación por PCR con dicho par de cebadores de la epata (b) en condiciones adecuadas para producir un producto de amplificación cuando dicho elemento IS localizado de forma exclusiva está presente en dicha muestra de ácido nucleico, y
  - (d) identificar la presencia o la ausencia de una cepa bacteriana acidoláctica detectando la presencia o la ausencia de dicho producto de amplificación,
  - 15 en donde dicha cepa bacteriana acidoláctica es la cepa de *Pediococcus*, *Pediococcus acidilactici*, representada por el aislado depositado el 25 de septiembre de 2009 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con el número de acceso DSM 22981, y
  - 20 en donde el par de cebadores específico para una región de dicho elemento IS localizado de forma exclusiva y una región de una secuencia de ácido nucleico adyacente a dicho elemento IS localizado de forma exclusiva comprende un primer cebador de la SEC ID N.º 1 y un segundo cebador de la SEC ID N.º 2.
2. Una cepa bacteriana acidoláctica *Pediococcus acidilactici* representada por el aislado depositado el 25 de septiembre de 2009 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con el número de acceso DSM 22981.
- 25
3. Uso de una cepa bacteriana acidoláctica de acuerdo con la reivindicación 2 o de un cultivo puro de la misma o de una composición de cultivo de la misma como cultivo de partida o de un cultivo auxiliar.
4. Uso de una cepa bacteriana acidoláctica de acuerdo con la reivindicación 2 en la producción de un producto lácteo, preferiblemente queso.
- 30
5. Un método de preparación de un producto lácteo, que comprende añadir a la leche una cantidad eficaz de una cepa bacteriana acidoláctica de acuerdo con la reivindicación 2 o un cultivo puro de la misma o una composición de cultivo de la misma.
- 35
6. Un producto lácteo que comprende una cepa bacteriana acidoláctica de acuerdo con la reivindicación 2 o un cultivo puro de la misma o una composición de cultivo de la misma.
7. Uso de una cepa bacteriana acidoláctica de acuerdo con la reivindicación 2 o de un cultivo puro de la misma o de una composición de cultivo de la misma para la identificación de un producto lácteo, preferiblemente queso.
- 40
8. Método para marcar un producto lácteo para la identificación y certificado de origen, que comprende añadir a una composición de partida de queso, una cepa bacteriana acidoláctica de acuerdo con la reivindicación 2 o un cultivo puro de la misma o una composición de cultivo de la misma.