

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.,

Abogado
JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

ASUNTO Radicación 09 011069
 Trámite 011
 Evento 378
 Actuación 519
 Oficio
 Folios 07 1 25 1 5

Patente de Invención	☒	Patente de Modelo de Utilidad	☐
Vía Nacional	☐		
Vía PCT (Fase Nacional)	☒	Cap. I	☒
		Cap. II	☐

No. Solicitud Internacional PCT/FR2007/000916
Fecha de Presentación Internacional 01/Junio/2007

Como resultado del Examen de Fondo realizado, con fundamento en el Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción:	Folios 76 a 89	05/Febrero/2009
	Folios 91 a 141	05/Febrero/2009
	Folio 200	26/Agosto/2009
Reivindicaciones:	Folios 142 a 148	05/Febrero/2009
Dibujos:	Folios 150 a 158	05/Febrero/2009
Prioridad:	FR 0606421	13/Julio/2006

2. Análisis de la Prioridad

Se acepta la reivindicación de Prioridad porque esta solicitud fue presentada dentro del plazo establecido (Art. 9 D 486) y su contenido técnico corresponde con el de la prioridad reivindicada.

3. Objeto de la invención

Título de la solicitud: "Gránulos de cisteína y sus usos como activadores de crecimiento de *Bifidobacterium animalis Lactis*".

El problema planteado en esta solicitud consiste en la necesidad de suministrar un inóculo para la fabricación de leche fermentada.

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona gránulos congelados y/o liofilizados que contienen L-cisteína, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* y otras bacterias ácido lácticas que fermentan un sustrato lácteo.

El objeto de la presente Solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) A23C 9/13 y A23C 9/123.

4. De la Solicitud de Patente

Titulo

El título debe modificarse para mencionar de forma adecuada el microorganismo como *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* o *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*. Teniendo en cuenta que en cursiva va *Bifidobacterium animalis lactis* y en forma normal subsp. o ssp.

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

Se sugiere en todo el capítulo reivindicatorio mencionar de forma adecuada el microorganismo como *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* o *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*.

Las reivindicaciones 1, 5 a 11 y 15 a 22 no son claras por que las expresiones "al menos", "por lo menos", "especialmente adaptado", "el mantenimiento del sustrato inoculado en condiciones de temperatura y atmósfera favorables al metabolismo" y "con alto valor prebiótico" son imprecisos, por lo cual no permite distinguir la invención del estado de la técnica. Se sugiere sustituirlo por un término preciso o un rango concreto.

Las reivindicaciones 1, 2, 18 y 19 no son claras porque las expresiones "para la transformación de sustrato lácteo", "adaptado al consumo humano", "de manera que el pH de la solución obtenido por: descongelación del (de los) gránulos (S), y/o resolubilización de (de los) liofilizados en una proporción de 1 a 2 gramos de liofilizados por 8 a 10 ml de H₂O, es al menos igual a 4", "presenta un pH superior a 4 mientras está en solución", "suceptible de ser extraído de un inóculo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17", "el pH de la solución obtenido después de la descongelación de (de los) granulo (s) es al menos igual a 4", "susceptible de ser inóculo" "de tal forma que el pH de la solución obtenido después de la resolubilización del (de los) liofilizados (s) en una proporción de 1 a 2 gramos de liofilizados por 8 a 10 ml de H₂O, es al menos igual a 4" son resultados a alcanzar, lo que no esta permitido, no definen al producto y/o método porque la invención no queda definida por el resultado a alcanzar, puesto que la reivindicación incluiría no sólo la solución propuesta por el solicitante, sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ese resultado. Se sugiere remplazarlo por las características esenciales estructurales que contribuyen a la obtención de ese efecto.

Las reivindicaciones 1 y 13 no son claras porque los término "O" y "autolisato" presentan errores de digitación. Se sugiere hacer la corrección necesaria.

Las reivindicaciones 20 y 22 aunque están definidas por las características técnicas esenciales del método hacen referencia a las reivindicaciones de producto, lo cual no es permitido. Se sugiere eliminar la dependencia a las reivindicaciones 1 a 19, mencionando las características técnicas esenciales. Al respecto no debe olvidarse

que las reivindicaciones de producto y de procedimiento son diferentes y, por ello, deben redactarse de manera independiente en el pliego reivindicatorio. Sobre las mismas, el Tribunal Andino de Justicia ha dicho lo siguiente:

“El objeto de la invención de producto esta constituido por un cuerpo cierto destinado a llenar una necesidad industrial que el estado de la técnica aun no ha satisfecho. En cambio, el objeto de la invención de procedimiento se encuentra conformado por “una serie o sucesión de operaciones que inciden sobre una materia (solida, liquida o gaseosa) que se encamina a la obtención de una cosa o un resultado”. (Otero Lastres, José Manuel. Ob. Cit)¹.

¹Proceso 129aIPa2007

Descripción (Art 28 D 486)

La Descripción aunque es clara y permite establecer el problema técnico y su solución presenta una que otra inconsistencia porque las siguientes expresiones:

Fl. 76 Línea 10, "*aumentación*"; Fl. 76, Línea 15, "*fermentos dichos técnicas o tecnologías y fermentos probióticos*"; Fl. 76, Línea 17 "*sepas*"; Fl. 77, Línea 11 "*y no estimulen el crecimiento de las cepas dichas técnicas sean de calidad alimenticia y que no degraden la organoléptica del producto*"; Fl. 79 Línea 29 "*cisteína- CCl*" y Fl. 99, Línea 3 "*de cuerdo*" presentan errores en la redacción y/u ortografía.

Adicionalmente la expresión Fl. 130, Línea 18 "*azoto líquido*" es poco reconocida en el campo técnico de la invención. Se sugiere sustituirla por un término o expresión reconocida.

Se sugiere en todo la descripción mencionar de forma adecuada el microorganismo como *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* o *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*.

5. Determinación del Estado de la Técnica

El estado de la técnica se determinó con base en la fecha de presentación de la solicitud de prioridad: 13 de julio de 2006 y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Item	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	US 2001/0049132	Method for supply of starter cultures having a consistent quality	06/Diciembre/2001
D2	Art 1 ¹	A Bile Salt-Resistant Derivative of <i>Bifidobacterium animalis</i> Has an Altered Fermentation Pattern when Grown on Glucose and Maltose	Noviembre/2005

¹ Ruas Madiedo P, Hernández-Barranco A, Margolles A, et al. Applied and environmental biotechnology. 2005. Vol 71(11).Págs. 6564 y 6565. Fls. 205 y 206.

D1http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=worldwide.espacenet.com&II=0&ND=3&adjacent=true&locale=en_EP&FT=D&date=20011206&CC=US&NR=2001049132A1&KC=A1 divulga inoculos liofilizados y/o congelados para la industria que emplea la fermentación como proceso de obtención de un producto de interés (Pág.1, Párr. 1; Pág. 2, Párr. 25).

D2 divulga L-cisteína como suplemento al medio de cultivo para crecer *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Pág. 6565. Párr.2 y Párr. 3).

6. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Nivel inventivo (Art 18 D486)

La reivindicación 1 consiste en un inóculo que es especialmente adaptado a la inoculación directa de al menos una cepa de *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* en un sustrato lácteo, para la transformación del sustrato lácteo en producto lácteo fermentado adaptado al consumo humano.

La reivindicación 1 es larga y continúa. Ver Fl. 142.

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D2
Inóculo de <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> en sustrato lácteo	Método para proporcionar un inóculo de <i>Bifidobacterium</i> a lácteos (Pág.1, Párr. 11 a Párr. 13; Pág. 4, Párr. 41)	No se menciona
Tiene L-cisteína libre	No se menciona	Se proporciona L-cisteína (0,05% p/v) para el crecimiento de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (Pág. 6565. Párr.2 y Párr. 3).
Las cisteína sola o acompañada con el microorganismo esta en gránulos	El inóculo puede contener aparte de los microorganismos aminoácidos (Pág.2, Párr. 17)	No se menciona
Los gránulos están congelados o liofilizados	El inóculo está congelado o liofilizado (Pág. 2, Párr. 25)	No se menciona
Por un gramo de cisteína hay 1×10^{14} o 3.5×10^{10} UFC	Los microorganismos en el inóculo se encuentran en concentraciones de 5×10^{12} UFC (Pág. 3, Párr. 31).	No se menciona

Los documentos D1 y D2 se consideran el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 3 porque divulgan un método para producir y crecer inóculos de *Bifidobacterium*.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y el inóculo de D1 consiste en que esta anterioridad no menciona la L-cisteína.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y el estudio de D2 consiste en que dicha anterioridad no se producen inóculos para la industria láctea.

El efecto que logra el incluir la L-cisteína en el inóculo es que permite obtener una mayor población de *B. animalis* subsp. *lactis* en la fermentación al introducir el inóculo en el sustrato lácteo lo que hace el sistema más eficiente.

Por lo tanto, el Problema Técnico Objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así "cómo modificar el inóculo que presenta *Bifidobacterium* en D1 para que se obtenga una mayor cantidad de esta bacteria y sea más eficiente".

Sin embargo, el uso de L-cisteína como suplemento en el medio de cultivo para crecer *B. animalis* subsp. *lactis* ya ha sido divulgado en el documento D2 que se refiere a un estudio para determinar la asimilación de maltosa y glucosa por *B. animalis* subsp. *lactis* (Pág. 6565. Párr.2 y Párr. 3).

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría la L-cisteína de D2 en el inóculo de D1 en el gránulo que sirve de inóculo para llegar así al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud.

Puesto que las reivindicaciones dependientes 3 a 19 no mencionan características inventivas que hagan inventiva la solicitud, tampoco se pueden considerar inventivas, ya que D1 divulga que se pueden emplear en el inóculo otras bacterias y que los microorganismos en el inóculo se encuentran en concentraciones de 5×10^{12} UFC (Pág. 3, Párr. 31; Pág.5, Párr. 45) y asimismo D2 divulga el medio MRS que contiene máximo 0,4% p/p de extracto de levadura (Pág. 6565. Párr. 3). Por lo tanto la relación L-cisteína/ UFC en el granulo representa solamente la adición de L-cisteína como aminoácido esencial para la fermentación, debido a la falencia que posee el *B. animalis* subsp. *lactis* para su obtención y/o síntesis.

Conclusión: Las reivindicaciones 1 y 3 a 19 cumplen el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumplen con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

La reivindicación 20 consiste en un método de estimulación del crecimiento y/o metabolismo de *B. animalis lactis* en el sustrato lácteo, que comprende:

- la inoculación de un sustrato lácteo por al menos un inóculo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 17, y/o por, al menos un gránulo de acuerdo con la reivindicación 18, y/o por lo menos un liofilizado de acuerdo con la reivindicación 19 y
- el mantenimiento del sustrato inoculado en condiciones de temperatura y atmósfera favorables al metabolismo de *B. animalis lactis*.
-

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D2
Método para estimular el crecimiento de <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> en sustrato lácteo	Método para proporcionar un inóculo de <i>Bifidobacterium</i> a lácteos (Pág.1, Párr. 11 a Párr. 13; Pág. 4, Párr. 41)	No se menciona
Inoculación del sustrato lácteo	Inoculación del sustrato lácteo (Pág. 5, Párr.55 y Párr.58)	No se menciona
Se proporciona L-cisteína libre	No se menciona	Se proporciona L-cisteína (0,05% p/v) para el crecimiento de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (Pág. 6565. Párr.2 y Párr. 3).
La cisteína sola o acompañada con el microorganismo esta en gránulos	El inóculo puede contener aparte de los microorganismos aminoácidos (Pág.2, Párr. 17)	No se menciona
Los gránulos están congelados o liofilizados	El inóculo está congelado o liofilizado (Pág. 2, Párr. 25)	No se menciona
Por un gramo de cisteína hay 1×10^{14} o 3.5×10^{10} UFC	Los microorganismos en el inóculo se encuentran en concentraciones de 5×10^{12} UFC (Pág. 3, Párr. 31)	No se menciona

Se mantienen condiciones ambientales para que crezca el microorganismo	Se mantienen condiciones ambientales para que crezca el microorganismo (Pág.6, Párr. 65)	Se mantienen condiciones ambientales para que crezca el microorganismo (Pág. 6565. Párr.2 y Párr. 3).
--	--	---

Los documentos D1 y D2 se consideran el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 20 porque divulgan métodos para producir y crecer inóculos de *Bifidobacterium*.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 20 y el método de D1 consiste en que esta anterioridad no menciona la L-cisteína.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 20 y el estudio de D2 consiste en que dicha anterioridad no se producen inóculos para la industria láctea.

El efecto que logra el incluir la L-cisteína en el inóculo es que permite obtener una mayor población de *B. animalis* subsp. *lactis* en la fermentación al introducir el inóculo en el sustrato lácteo lo que hace el sistema más eficiente.

Por lo tanto, el Problema Técnico Objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así "cómo modificar el método para estimular el crecimiento *Bifidobacterium* en D1 para que se obtenga una mayor cantidad de esta bacteria y sea más eficiente".

Sin embargo, el uso de L-cisteína como suplemento en el medio de cultivo para crecer *B. animalis* subsp. *lactis* ya ha sido divulgado en el documento D2 que se refiere a un estudio para determinar la asimilación de maltosa y glucosa por *B. animalis* subsp. *lactis* (Pág. 6565. Párr.2 y Párr. 3).

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría la L-cisteína de D2 en el método de D1 para estimular el crecimiento de *B. animalis* subsp. *lactis* y llegar así al objeto de la reivindicación 20 de la solicitud.

Puesto que las reivindicaciones dependientes 21 a 23 no mencionan características inventivas que hagan inventiva la solicitud, tampoco se pueden considerar inventivas, ya que D1 divulga que se pueden emplear en el inóculo otras bacterias y que los microorganismos en el inóculo se encuentran en concentraciones de 5×10^{12} UFC (Pág. 3, Párr. 31; Pág.5, Párr. 45). Por lo tanto la relación L-cisteína/ UFC en el granulo representa solamente la adición de L-cisteína como aminoácido esencial para la fermentación, debido a la falencia que posee el *B. animalis* subsp. *lactis* para su obtención y/o síntesis.

Conclusión: Las reivindicaciones 20 a 23 cumplen el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumplen con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

7. Conclusión

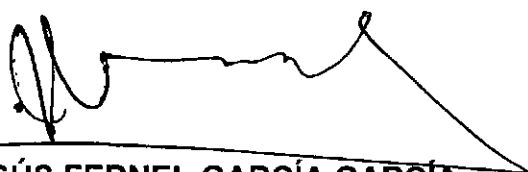
Los requisitos de Patentabilidad de la presente Solicitud están afectados así:

Item	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	CH 677791	1, 3 a 23	Nivel inventivo
D2	Art 1	1, 3 a 23	Nivel inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Se invita al solicitante se sirva indicar, si así lo considera, su renuncia al término faltante para sesenta (60) días y presentarla por escrito.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.



JESÚS FERNEL GARCÍA GARCÍA
Director de Nuevas Creaciones (E)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha

19 8 JUL. 2012

Elaborado por: Jorge Eduardo Cortázar Gómez JEC
Revisado por: Rosa Patricia Tellez Chavarro R

A Bile Salt-Resistant Derivative of *Bifidobacterium animalis* Has an Altered Fermentation Pattern When Grown on Glucose and Maltose

Patricia Ruas-Madiedo, Ana Hernández-Barranco, Abelardo Margolles, and Clara G. de los Reyes-Gavilán*

Instituto de Productos Lácteos de Asturias, CSIC, Carretera de Infesto s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias, Spain

Received 25 May 2005/Accepted 16 June 2005

The growth of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA 4549 and its derivative with acquired resistance to bile, *B. animalis* subsp. *lactis* 4549dOx, was evaluated in batch cultures with glucose or the glucose disaccharide maltose as the main carbon source. The acquisition of bile salt resistance caused a change in growth pattern for both sugars, which mainly resulted in a preferential use of maltose compared to glucose, whereas the mother strain used both carbohydrates in a similar way. High-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry analyses were performed to determine the amounts of glucose consumption and organic acid and ethanol formation from glucose by buffered resting cells taken at different points during growth. Resting cells of the bile-adapted strain generally consumed less glucose than those of the nonadapted one but showed an enhanced production of ethanol and higher acetic acid-to-lactic acid as well as formic acid-to-lactic acid ratios. These findings suggest a shift in the catabolism of carbohydrates promoted by the acquisition of bile resistance that may cause changes in the redox potential and improvements in the cellular ATP yield.

Some strains of the genus *Bifidobacterium* are considered probiotics and are used as active ingredients in functional dairy-based products. Strains of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* have been largely applied in fermented dairy products instead of other species due to their better technological properties (7). Microorganisms of the genus *Bifidobacterium* can colonize the colon and are important components of the human intestinal microbiota, in which they may be present at concentrations of 10^9 to 10^{10} cells per gram of feces (36). To achieve this colonization, these bacteria must overcome biological barriers that include acid in the stomach and bile in the intestine (5, 28, 34).

Bile salts are synthesized in the liver from cholesterol and secreted as amino acid conjugates into the duodenum, where they facilitate fat absorption. Since these compounds are toxic for microbial cells, the autochthonous gastrointestinal microbiota must have developed strategies to defend themselves against the toxic action of bile, although these mechanisms still remain poorly understood.

Some dietary carbohydrates not digested in the upper gastrointestinal tract can act as substrates for bacterial fermentation in the colon (8). Among these carbohydrates, those that are selectively fermented by beneficial microorganisms are generally known as prebiotics (12). The ability to degrade oligo- or polysaccharides has been related to the presence in the cell of the corresponding glycoside-hydrolyzing activities (13, 17, 29, 42). In bifidobacteria, the fermentation of hexoses

released from oligo- or polysaccharides occurs by the D-fructose 6-phosphate shunt, whose characteristic key enzyme, fructose 6-phosphate phosphoketolase (6, 24), is not present in other gram-positive intestinal bacteria. It has been reported that bifidobacteria may alter the preferential direction of their metabolic pathways, and subsequently the ratio of organic acids produced during fermentation, based upon the carbohydrates available for their use (29, 38, 42). Some of the end products of carbohydrate metabolism in bifidobacteria (lactic, acetic, and formic acids) can exert beneficial effects on human health (37).

A relationship seems to exist between the assimilation of oligosaccharides and the level of bile salt resistance in bifidobacteria. In general, the presence of a metabolizable carbon source could alleviate the toxic effect of bile salts (11, 30). It has been demonstrated that resistance to bile was increased in medium containing fructo-oligosaccharides compared to medium containing their monomeric components (30). Since the cellular detoxification of bile salts is an energy-dependent mechanism (30), the predicted higher yields of energy on oligosaccharides than that on monosaccharides might contribute towards increased bile salt resistance (11, 29, 35, 38). Therefore, it could be hypothesized that a bile-adapted microorganism should have optimized the cellular ways to obtain energy from available carbon sources. In a related study, we recently indicated that fructose 6-phosphate phosphoketolase and glycosidic activity levels could be modified in some cases as a consequence of the acquisition of bile salt resistance (26, 32). At the same time, preliminary evidence obtained by us indicated that the acquisition of bile salt resistance in bifidobacteria can modify growth in medium containing glucose or maltose as the carbon source (10).

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Productos Lácteos de Asturias, CSIC, Ctra. Infesto s/n, Apartado 85, 33300 Villaviciosa, Asturias, Spain. Phone: 34-985893335. Fax: 34-985892233. E-mail: greyes_gavilan@ipla.csic.es.

Several studies of amylolytic *Bifidobacterium* strains have been conducted in past years (16, 21, 22). Starch is one of the main components of some tubers, legumes, and cereal grains (3). In spite of the importance of these vegetal foods in the human diet throughout the world, fermentation patterns of gluco-oligosaccharides have remained considerably less studied than those of fructo- and galacto-oligosaccharides (13, 15, 17, 30, 33, 38, 42).

Maltose ([1,4]- α -D linkages) is a glucose disaccharide that can result from the partial hydrolysis of starch by intestinal bacteria. In the present work, we analyze differences in growth and fermentation patterns of the strain *B. animalis* subsp. *lactis* IPLA 4549 and its bile-resistant derivative *B. animalis* subsp. *lactis* 4549dOx (14, 26) in medium containing glucose or maltose as the carbon source.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture media. The microorganisms used in this study were the mother strain *B. animalis* IPLA 4549 and its bile-resistant derivative *B. animalis* 4549dOx, obtained previously by adaptation of the mother strain to progressively increasing concentrations of bovine bile (ox gall) (26). The induced bile resistance phenotype was stable after several subcultures in medium with glucose in the absence of bile (data not shown), and the adapted microorganism retained the resistance level until stationary phase. The mother and derivative strains, previously grown at 37°C in MRS broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) with 0.05% (wt/vol) L-cysteine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (MRSC) and in MRSC supplemented with 0.8% (wt/vol) ox gall (Sigma), respectively, were maintained as frozen stocks at -80°C in MRSC with 20% (vol/vol) glycerol. Prior to the experiments, cultures were revived from frozen stocks by incubation overnight in 10 ml MRSC in an anaerobic chamber (Mac500; Down Whitley Scientific, West Yorkshire, United Kingdom) under a 10% (vol/vol) H₂, 10% (vol/vol) CO₂, and 80% (vol/vol) N₂ atmosphere.

A basal fermentation medium (FM) (tryptone, 10 g/liter; bacteriological meat extract, 8 g/liter; yeast extract, 4 g/liter; dipotassium phosphate, 2 g/liter; diammonium citrate, 2 g/liter; sodium acetate, 5 g/liter; magnesium sulfate, 0.2 g/liter; manganese sulfate, 0.04 g/liter; and L-cysteine, 0.5 g/liter), added with 20 g/liter of the corresponding sugar, was used for fermentation experiments with glucose and maltose as the carbon source.

Identification and identity of mother and bile-resistant derivative strains. Identification to the species level of the mother strain and its bile-resistant derivative as well as the identity between both strains was corroborated by partially sequencing the 16S rRNA gene. Isolated colonies of microorganisms were washed and resuspended in 500 μ l deionized water. Cell suspensions were heated for 10 min at 98°C and then centrifuged (16,000 $\times$ g, 10 min). PCR mixtures were composed of 5 μ l of the supernatant, a 0.25 μ M concentration of each primer, a 200 μ M concentration of each deoxynucleoside triphosphate (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Roche Diagnostics, S.L., Barcelona, Spain) in a final volume of 50 μ l. Amplification of the DNA was performed using the following two pairs of primers: Y1 and Y2 (43), which flanked a portion of approximately 350 bp, including the variable regions V1 and V2 of the 16S rRNA coding gene (25), and Bif164 and Bif662, which allowed the amplification of a fragment of ~523 bp between variable regions V2 and V4 of the 16S rRNA gene (20). The thermal cycle program used consisted of the following time and temperature profile: an initial cycle of 95°C for 5 min, 30 cycles of 94°C for 45 s, 56°C for 1 min, and 72°C for 45 s, and a final extension step of 10 min at 72°C. DNA amplification was performed in a PCR Sprint thermal cycler (Hybaid Ltd., Ashford, Middlesex, United Kingdom). Amplified products were subjected to gel electrophoresis in 1% agarose gels and were visualized by ethidium bromide staining.

PCR products were purified using a GenElute PCR clean-up kit (Sigma) to remove unincorporated primers and nucleotides. Automated sequencing of one strand of the PCR products was done at the Servicio de Secuenciación (University of Oviedo, Spain) with primer Y1 or Bif164 in a 373A automated gene sequencer (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (1) program was used to compare the sequences obtained with those of reference strains held in GenBank.

The identification of *B. animalis* strains to the subspecies level was achieved as described by Ventura and Zink (40, 41). DNAs were obtained as indicated above. A fragment of approximately 770 bp corresponding to the 16S-23S internal

transcribed spacer rRNA gene region was amplified with primers 16S-for and 23S-r. The PCR products were digested with the restriction enzyme *Sau*3AI and visualized by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining.

Growth in medium containing glucose or maltose as a carbon source. Overnight cultures in MRSC were washed twice with the same volume of FM at room temperature. Afterwards, 150- μ l aliquots of washed cultures were resuspended in tubes containing 15 ml of FM with glucose or maltose. Batch cultures were incubated at 37°C in an anaerobic chamber, and the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) and the pH were measured throughout incubation. Two independent fermentations for each sugar were carried out simultaneously.

Preparation and incubation of resting cells. *Bifidobacterium* cells were collected by centrifugation (10,000 $\times$ g, 15 min) from cultures in FM plus glucose or maltose at three defined sampling points through growth (exponential phase, beginning of stationary phase, and late stationary phase) (Table 1). The pellet of each tube was washed twice with 33 mM potassium phosphate buffer, pH 6.5, and then resuspended in 10 ml of 33 mM potassium phosphate buffer, pH 5.6, containing 25 mM glucose. The resting cell suspension was incubated with constant mild stirring at 37°C for 4 h in an anaerobic jar with the Anaerocult A system (Merck, Darmstadt, Germany).

Determination of organic acids and glucose by HPLC analysis. Cells were removed from the suspension of resting cells by centrifugation, and the supernatant was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) to determine the amounts of glucose consumption and acetic, lactic, and formic acid formation. A chromatographic system composed of an Alliance 2690 module injector, a Photodiode Array PDA 996 detector, a 410 differential refractometer detector, and Millennium 32 software (Waters, Milford, MA) was used. Resting cell supernatants (50 μ l) were separated isocratically at a flow rate of 0.7 ml/min at 65°C on a 300- by 7.8-mm HPX-87H Aminex ion-exchange column (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) protected by a H⁺ cation Microguard cartridge (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA), using 3 mM sulfuric acid as the mobile phase. The PDA 996 detector was used for the identification and quantification of organic acids at 210 nm, whereas the amount of glucose was analyzed with the 410 refractometer. Standard solutions of lactic, acetic, and formic acids as well as glucose were run separately for the identification and quantification of each compound. Results at each sampling point were expressed as concentrations per cell OD₆₀₀ (mM/OD₆₀₀ unit).

For mother and derivative strains grown in glucose and maltose, we calculated for the previously defined sampling points the acetic acid-to-lactic acid (A/L) and formic acid-to-lactic acid (F/L) molar ratios as well as the carbon balance of formic acid formation, using the following formula:

$$\text{mol carbon formed as formic acid/mol glucose consumed} = \frac{1 \times [\text{formic acid}]}{6 \times [\text{glucose}]}$$

where amounts within brackets indicate concentrations (mM) of the corresponding products.

Considering that for the fructose 6-phosphate shunt (Fig. 1) the production of 1 mol of acetic acid gives rise to the formation of 1 mol of ATP, 1 mol of lactic or formic acid generates 2 mol of ATP, and the phosphorylation of glucose at the beginning of glycolysis consumes 1 mol of ATP (2), we estimated the theoretical energetic ATP yield (theoretical mol of ATP formed per mol of glucose consumed) for the same sampling points indicated above, using the following formula:

$$\text{mol ATP/mol glucose consumed} =$$

$$\frac{1 \times [\text{acetic acid}] + 2 \times [\text{formic acid} + \text{lactic acid}] - 1 \times [\text{glucose consumed}]}{1 \times [\text{glucose consumed}]}$$

where amounts within brackets indicate concentrations (mM) of the corresponding products.

Determination of ethanol level by dynamic headspace extraction and GC-MS analysis. Dynamic headspace extraction and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis were used to determine the amount of ethanol in supernatants of resting cells from cultures with glucose or maltose as the carbon source. A system composed of a 3100 purge and trap concentrator (Tekmar and Dohrmann, Cincinnati, OH) fitted with a Vocab 3000 trap (Supelco/Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain) was used. The concentrator was coupled to a gas chromatograph (GC 6890N; Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA) connected to a mass spectrometer detector (MS 5973N; Agilent). Data were collected with Enhanced ChemStation G1701DA software (Agilent).

Resting cell supernatants (1.5 ml), obtained as previously described, were mixed with 10 μ l of an internal standard (IS) aqueous solution containing 0.156 mg/ml of propyl acetate (Chem Service Inc., West Chester, PA). Samples were