

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 177**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2013 PCT/EP2013/058655**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013 WO13160413**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2013 E 13719516 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **21.02.2024 EP 2841557**

54 Título: **Uso de bacterias del ácido láctico para preparar productos alimenticios fermentados con dulzor natural aumentado**

30 Prioridad:

25.04.2012 EP 12165517
20.12.2012 EP 12198766

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
11.07.2024

73 Titular/es:

CHR. HANSEN A/S (100.0%)
Boege Allé 10-12
2970 Hoersholm, DK

72 Inventor/es:

JOHANSEN, ERIC;
SOERENSEN, KIM IB;
CURIC-BAWDEN, MIRJANA y
JUNGE, METTE PIA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

DESCRIPCIÓN

Uso de bacterias del ácido láctico para preparar productos alimenticios fermentados con dulzor natural aumentado

5 **Campo de invención**

La presente invención se refiere a cepas de bacterias *Streptococcus thermophilus* y a cultivos con propiedades edulcorantes por excreción de altos niveles de glucosa formada por degradación de lactosa, a cepas de bacterias *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* con propiedades edulcorantes por excreción de altos niveles de glucosa formada por degradación de lactosa, a cultivos iniciadores que comprenden tales cepas y a productos lácteos fermentados con los cultivos. La presente invención también se refiere a un método de obtención de tales cepas y al uso de tales cepas para la preparación de productos lácteos fermentados y para aumentar el dulzor de productos lácteos fermentados al tiempo que se disminuye el contenido en lactosa de los productos lácteos fermentados.

15 **Antecedentes de la invención**

Los productos lácteos fermentados puros se reconocen por un sabor ácido o agrio como resultado de la conversión de la lactosa en ácido láctico por bacterias del ácido láctico durante la fermentación. Por tanto, a menudo, se endulzan mediante la adición de edulcorantes de fruta, miel, azúcar o artificiales para satisfacer el deseo de los clientes de un producto de sabor más dulce.

La industria alimentaria tiene una demanda cada vez más alta de productos alimenticios de sabor dulce bajos en calorías con el fin de ayudar a superar los problemas de sobrepeso y obesidad que se han vuelto tan prevalentes en los últimos 20 años. El dulzor, habitualmente considerado como una sensación agradable, se produce por la presencia de azúcares y algunas otras sustancias. La percepción de los azúcares es muy diferente. Usando sacarosa como referencia 100, el dulzor de la lactosa es de 16, de la galactosa 32 y de la glucosa 74 (Godshall (1988). Food Technology 42(11):71-78). La glucosa se percibe por tanto más de 4 veces más dulce que la lactosa al tiempo que tiene todavía aproximadamente el mismo nivel de calorías.

El azúcar en los productos alimenticios fermentados se está reemplazando más a menudo por edulcorantes tales como aspartamo, acesulfamo K, sucralosa y sacarina que pueden proporcionar el dulzor con una menor ingesta de calorías. Sin embargo, el uso de edulcorantes artificiales puede dar como resultado un sabor desagradable y varios estudios que indican que el consumo de edulcorantes artificiales está conectado con inconvenientes tales como aumento del hambre, alergias, cáncer etc., han contribuido a la preferencia del consumidor por productos lácteos fermentados que solo contienen edulcorantes naturales o, preferiblemente, no contienen edulcorantes añadidos.

Por tanto, un desafío especial radica en el desarrollo de productos lácteos fermentados en los que el edulcorante natural (interno) es alto.

La acidez de los productos lácteos fermentados depende en gran parte de las bacterias del ácido láctico presentes y los parámetros del proceso usados para preparar el producto lácteo fermentado.

La fermentación del disacárido lactosa está muy estudiada en bacterias del ácido láctico porque es la principal fuente de carbono en la leche. En muchas especies, la lactosa se escinde por β -galactosidasa para dar glucosa y galactosa tras su captación. La glucosa se fosforila por glucocinasa a glucosa-6-fosfato y se fermenta por medio de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (glicólisis) por la mayoría de las bacterias del ácido láctico (figura 1).

Streptococcus thermophilus es una de las bacterias del ácido láctico más ampliamente usadas para fermentación láctea termófila comercial en la que el organismo se usa normalmente como parte de un cultivo iniciador mixto, siendo el otro componente un *Lactobacillus* sp., por ejemplo, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* para yogur o *Lactobacillus helveticus* para queso suizo.

La definición legal de yogur en muchos países requiere *Streptococcus thermophilus* junto con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Ambas especies generan cantidades deseables de acetaldehído, un componente de aroma importante en el yogur.

La lactosa y sacarosa se fermentan más fácilmente por *Streptococcus thermophilus* que sus monosacáridos componentes. En presencia de galactosa en exceso, solo la porción de glucosa de la molécula de lactosa se fermenta y se acumula galactosa en productos lácteos fermentados cuando se usa *Streptococcus thermophilus*. En yogur, en donde altas concentraciones de ácido limitan la fermentación, permanece galactosa libre mientras que la galactosa libre producida en las fases tempranas de la fabricación de queso suizo se fermenta posteriormente por *Lactobacillus helveticus*.

Sin embargo, varios investigadores han notificado cepas fermentadoras de galactosa tanto de *Streptococcus thermophilus* como de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Hutkins *et al.* (1986) J. Dairy Sci. 69(1):1-8; Vaillancourt *et al.* (2002) J. Bacteriol. 184(3); 785-793) y en el documento WO 2011/026863 (Chr. Hansen) se describe

un método para obtener cepas de *Streptococcus thermophilus* que son fermentadoras de galactosa.

Con el fin de cumplir los requisitos de la industria alimentaria, se ha vuelto relevante proponer nuevas cepas, en particular cepas de *Streptococcus thermophilus* y cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que proporcionen un dulzor más natural sin calorías extra directamente en el producto fermentado (dulzor interno) mediante excreción de glucosa.

Pool *et al.* (2006. *Metabolic Engineering* 8(5); 456-464) dan a conocer una cepa de *Lactococcus lactis* en la que el metabolismo de la glucosa está completamente alterado por delección de los genes que codifican para glucocinasa, EII(man/glc) y el recientemente descubierto glucosa-PTS EII(cel). El método de construcción es recombinación genética para la generación de todas las mutaciones y la cepa resultante es en consecuencia un organismo modificado genéticamente (OMG) que en la actualidad no puede usarse en productos alimenticios.

Thompson *et al.* (1985. *J Bacteriol.* 162(1); 217-223) estudiaron el metabolismo de la lactosa en *Streptococcus lactis* (hoy en día renombrada *Lactococcus lactis*). En este trabajo, se usó 2-desoxiglucosa para obtener un mutante en el sistema de manosa-PTS. Posteriormente, este mutante se mutagenizó usando mutagénesis por UV seguido por cribado de colonias negativas para glucosa mediante siembra en placa de réplicas. De este modo, se aisló un mutante doble (manosa PTS y glucocinasa). Este mutante doble se usó para estudiar los mecanismos implicados en la regulación de la fermentación de lactosa por organismos "iniciadores". Estos mutantes tienen varias desventajas en comparación con su cepa original, lo que los hace inadecuados para su inclusión en un cultivo iniciador comercial. El rendimiento celular de los mutantes era la mitad del de la cepa original por mol de lactosa fermentada y el tiempo de duplicación estaba significativamente aumentado en los mutantes cuando se hicieron crecer sobre lactosa. Asimismo, el rendimiento de ácido láctico era la mitad del de la cepa original por mol de lactosa fermentada. El comportamiento de estas cepas en leche no se analizó, pero se anticipa que la tasa de acidificación se reduciría significativamente.

Además, *Lactococcus lactis* generalmente no se elige para la producción de acetaldehído y no contribuye al cumplimiento de los requisitos para la definición legal de yogur.

Chervaux *et al.* (2000. *Appl. And Environ. Microbiol.*, 66, 5306-5311) estudiaron la fisiología de cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en un medio químicamente definido novedoso y aislaron mutantes resistentes a 2-desoxiglucosa que eran deficientes en la fermentación de glucosa. Se observaron varios fenotipos diferentes y se notificaron efectos específicos de cepa.

Ninguno de los enfoques anteriores soluciona el problema de proporcionar cepas de *Streptococcus thermophilus* y cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* con propiedades potenciadas para el endulzamiento natural de productos alimenticios que se fermentan usando tales cepas solas o junto con otras cepas de bacterias del ácido láctico.

Adicionalmente, ninguno de los enfoques anteriores soluciona el problema de disminuir el contenido en lactosa en productos alimenticios que se fermentan usando tales cepas hasta un nivel tolerable en individuos intolerantes a la lactosa.

Sumario de invención

En contraposición a la técnica anterior descrita anteriormente, los presentes inventores han encontrado que pueden seleccionarse cepas de *Streptococcus thermophilus* con una mutación en el gen de glucocinasa (*glcK*) mediante exposición de cepas de *Streptococcus thermophilus* fermentadoras de galactosa a 2-desoxiglucosa y que estas células digieren lactosa y galactosa y excretan glucosa al entorno cuando se hacen crecer sobre un sustrato lácteo.

Sorprendentemente, estas cepas de *Streptococcus thermophilus* solas son todavía completamente capaces de acidificar la leche, aunque el tiempo de acidificación hasta pH 5 se retrasa 2-5 horas. Por tanto, como tales, son útiles en aplicaciones de leche fermentada.

Sin embargo, muchas bacterias del ácido láctico usan glucosa como fuente de carbono y cualquier glucosa excretada puede consumirse por otros microorganismos presentes en el producto lácteo fermentado.

Para superar este problema, la presente invención proporciona mutantes resistentes a 2-desoxiglucosa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que o bien han perdido la capacidad de crecer sobre glucosa como fuente de carbono o bien presentan una capacidad alterada para crecer en tales condiciones. Las cepas mutantes de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* no solo no consumen glucosa secretada a la leche por otros microorganismos que podrían estar presentes, también excretan altas cantidades de glucosa al medio circundante y, sorprendentemente, son todavía completamente capaces de acidificar la leche, aunque el tiempo de acidificación hasta pH 5 se retrasa 2-5 horas. Por tanto, como tales, son útiles en aplicaciones de leche fermentada.

Tales bacterias de calidad alimentaria pueden usarse para fortificar productos lácteos fermentados con glucosa. La glucosa tiene un dulzor percibido mayor que tanto la lactosa como la galactosa y como tal la excreción de glucosa al

sustrato lácteo dará como resultado un dulzor percibido (interno) mayor en el producto lácteo fermentado.

Los inventores de la presente invención encontraron que cuando se fermenta un sustrato lácteo con una cepa de *Streptococcus thermophilus* y una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según la invención, el nivel de lactosa dentro de la leche disminuye significativamente.

La intolerancia a la lactosa es un estado provocado por la incapacidad para digerir la lactosa. La mayoría de los individuos intolerantes a la lactosa pueden tolerar cierta cantidad de lactosa en su dieta y la gravedad de sus síntomas (incluyendo náuseas, calambres, meteorismo, diarrea y flatulencia) aumenta con la cantidad de lactosa consumida.

Por tanto, es de gran importancia en la industria ser capaz de producir productos alimenticios que o bien están libres de lactosa o bien que tienen un contenido en lactosa reducido.

Hasta la fecha no se han definido valores límites comunes en la UE para el contenido en lactosa de productos alimenticios libres de lactosa o bajos en lactosa, pero la Autoridad finlandesa de seguridad alimentaria Evira establece que los valores límite nórdicos son un contenido en lactosa de menos de 10 mg/100 g o 100 ml para alimentos libres de lactosa y un contenido en lactosa de menos de 1 g/100 g o 100 ml para alimentos bajos en lactosa.

La industria láctea se enfrenta actualmente al problema de proporcionar una alternativa a la adición de edulcorantes a productos lácteos fermentados con el fin de lograr el sabor dulce deseado sin las calorías añadidas. Además, sería altamente ventajoso establecer un método para reducir la lactosa en productos lácteos fermentados hasta un nivel que será aceptable para consumidores intolerantes a la lactosa.

Los problemas anteriores se han solucionado proporcionando cepas de *Streptococcus thermophilus* mutantes y cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mutantes que excretan glucosa a la leche cuando se inocula leche B al 9,5% con 10^6 - 10^7 UFC/ml de una cepa de *Streptococcus thermophilus* según la invención o con 10^6 - 10^7 UFC/ml de una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según la invención y se fermenta con las cepas de *Streptococcus thermophilus* o la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según la invención a 40°C durante al menos 20 horas. Preferiblemente, tales cepas mutantes solas excretarán al menos 5 mg/ml de glucosa a la leche B cuando se inocula leche B al 9,5% con 10^6 - 10^7 UFC/ml de una cepa de *Streptococcus thermophilus* según la invención o con 10^6 - 10^7 UFC/ml de una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según la invención y se fermenta con las cepas de *Streptococcus thermophilus* o la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según la invención a 40°C durante al menos 20 horas. Las cepas son todavía completamente capaces de acidificar la leche, aunque el tiempo de acidificación hasta pH 5 se retrasa 2-5 horas. La leche fermentada final contiene menos de 15 mg/ml lactosa en la leche fermentada. La leche fermentada final tiene en consecuencia un índice de dulzor interno mayor de aproximadamente 2 veces o más.

Para proporcionar las cepas de *Streptococcus thermophilus*, los presentes inventores han encontrado un método de aislar cepas mutantes resistentes a 2-desoxiglucosa a partir de una cepa madre de *Streptococcus thermophilus* fermentadora de galactosa, preferiblemente una con una mutación en el operón de galactosa que aumenta la expresión de un operón no expresado o escasamente expresado anteriormente, en la que el fenotipo de resistencia a 2-desoxiglucosa está provocado por una mutación en el gen de glucocinasa (*glcK*) que inactiva parcial o totalmente la proteína codificada. El método comprende someter la cepa madre a 2-desoxiglucosa y seleccionar cepas mutantes que son capaces de crecer en presencia de 2-desoxiglucosa sobre placas de agar que contienen medio M17+galactosa al 2%, tal como se describe en el ejemplo 1 en el presente documento. Se examinan estos mutantes y se eligen las cepas que tienen una tasa de crecimiento que es mayor en medio M17+galactosa al 2% que en medio M17+glucosa al 2%.

Se encontró sorprendentemente que las cepas mutantes de *Streptococcus thermophilus* con una mutación en el gen de glucocinasa (*glcK*) pero con un sistema transportador de glucosa que funciona de manera aparentemente normal secretaban glucosa. Estos mutantes se denominaron CHCC15757 y CHCC15887.

Además, los inventores encontraron que podían seleccionarse cepas de *Streptococcus thermophilus* con una capacidad incluso mayor para la fermentación de lactosa y excreción de glucosa sometiendo las cepas de *Streptococcus thermophilus* con una mutación en el gen de glucocinasa a 2-desoxiglucosa y seleccionando cepas que son incapaces de crecer en leche B al 9,5% excepto cuando se añade sacarosa a la leche B en una concentración de tan solo el 0,01%. Un mutante de este tipo hiperfermentador de lactosa y secretor de glucosa se denominó CHCC16404.

Se encontró que CHCC16404 tiene una mutación en un gen de transportador de glucosa (*manM*) que da como resultado la inactivación de una proteína transportadora de glucosa responsable del transporte de glucosa al interior de la célula.

Para proporcionar las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, los presentes inventores han encontrado un método de aislar cepas mutantes resistentes a 2-desoxiglucosa de una cepa madre de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que o bien ha perdido la capacidad de crecer sobre glucosa como fuente de carbono o bien tiene

una capacidad alterada para crecer sobre glucosa como fuente de carbono. El método comprende someter la cepa madre a 2-desoxiglucosa y seleccionar cepas mutantes que son capaces de crecer en presencia de 2-desoxiglucosa sobre placas de agar que contienen medio MRS-IM que contiene lactosa al 2%, tal como se describe en el ejemplo 5 en el presente documento. Se examinan estos mutantes y se eligen cepas que o bien han perdido completamente o bien tienen una capacidad alterada para crecer sobre MRS-IM que contiene glucosa al 2% en comparación con la cepa madre que puede crecer sobre glucosa.

Según este hallazgo sorprendente, la presente invención se refiere a cepas novedosas de bacterias del ácido láctico, tal como en particular *Streptococcus thermophilus* con una mutación en el gen *glcK* solas o en combinación con mutantes de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que excretan glucosa al producto fermentado proporcionando un dulzor natural sin calorías extra, a un método para producir las cepas, a productos lácteos fermentados preparados usando tales cepas y al uso de tales cepas para preparar productos lácteos fermentados con dulzor aumentado y niveles de lactosa disminuidos.

Además, se encontró que las cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* de la invención, sorprendentemente, estimulaban el crecimiento de la cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®, una bacteria probiótica que no crece bien cuando está presente sola en la leche.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una representación esquemática del catabolismo de la lactosa en *Streptococcus thermophilus*. GlcK, glucocinasa; LacS, transportador de lactosa; LacZ, β -galactosidasa; GalM, mutarotasa; GalK, galactocinasa; GalT, galactosa-1-fosfato uridiltransferasa; GalE, UDP-glucosa 4 epimerasa; Gal1P, galactosa-1-fosfato.

La figura 2 representa la secuencia de ADN (SEQ ID NO. 1) del gen de glucocinasa (*glcK*) de *Streptococcus thermophilus*, así como la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO. 2). Se indican las sustituciones de nucleótidos individuales encontradas en CHCC15757 y CHCC15887, respectivamente.

La figura 3 representa el operón de *man* que codifica para el sistema de glucosa/manosa fosfotransferasa (PTS) en *Streptococcus thermophilus*. En comparación con la cepa madre, CHCC15757, se encontró que el mutante hiperfermentador de lactosa y secretor de glucosa CHCC16404 tenía una mutación en el gen *manM* que codifica para la proteína IIC^{Man} de la glucosa/manosa PTS. La mutación de G a T cambia el codón GAA para ácido glutámico en la posición de aminoácido 209 a un codón de terminación TAA (*) que aborta la traducción en CHCC16404 y que inactiva la función de la proteína.

La figura 4 representa la secuencia de ADN (SEQ ID NO. 5) del gen *manM* de la cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC15757, así como la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO. 6). Se indica la sustitución de un solo nucleótido encontrada en CHCC16404.

Divulgación detallada de la invención

Tal como se usa en el presente documento, el término "bacteria del ácido láctico" designa una bacteria Gram-positiva, microaerófila o anaerobia, que fermenta azúcares con la producción de ácidos incluyendo ácido láctico como ácido producido predominantemente, ácido acético y ácido propiónico. Las bacterias del ácido láctico más útiles industrialmente se encuentran dentro del orden "Lactobacillales" que incluye *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Enterococcus spp.* y *Propionibacterium spp.* Las bacterias del ácido láctico, incluyendo bacterias de las especies *Lactobacillus sp.* y *Streptococcus thermophilus*, normalmente se suministran a la industria láctea como cultivos o bien congelados o bien secados por congelación para la propagación del iniciador a granel o como los denominados cultivos "de inoculación directa" (*Direct Vat Set*) (DVS), destinados a inoculación directa en un recipiente de fermentación o tanque para la producción de un producto lácteo, tal como un producto lácteo fermentado. Tales cultivos se denominan en general "cultivos iniciadores" o "iniciadores"

El uso de los términos "un" y "una" y "el/la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) ha de interpretarse que cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" han de interpretarse como términos de extremos abiertos (es decir, que significan "que incluye, pero no se limita a"), a menos que se indique lo contrario. La mención de intervalos de valores en el presente documento simplemente pretende servir como un método abreviado de referencia individual a cada valor diferenciado que se encuentra dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor diferenciado se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que se contradiga claramente por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o expresiones a modo de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionados en el presente documento, pretende simplemente iluminar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ninguna

expresión en la memoria descriptiva debe interpretarse como indicativa de que algún elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la invención.

En algunos países, la definición legal de yogur requiere la presencia de tanto *Streptococcus thermophilus* como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Ambas especies generan cantidades deseables de acetaldehído, un componente de aroma importante en el yogur.

El queso, tal como el queso mozzarella y de pizza, así como el queso feta, también puede prepararse por fermentación usando tanto *Streptococcus thermophilus* como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Høier *et al.* (2010) en *The Technology of Cheesemaking*, 2ª Ed. Blackwell Publishing, Oxford; 166-192).

Con el fin de cumplir los requisitos de la industria alimentaria, se ha vuelto deseable desarrollar nuevas cepas, en particular cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y cepas de *Streptococcus thermophilus*, que producen más dulzor natural directamente en el producto fermentado (dulzor interno) sin aportar calorías extra.

Streptococcus thermophilus es una de las bacterias del ácido láctico más ampliamente usadas para la fermentación de leche comercial, donde el organismo se usa normalmente como parte de un cultivo iniciador mixto, siendo el otro componente un *Lactobacillus* sp., por ejemplo, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* para yogur y *Lactobacillus helveticus* para queso suizo.

La lactosa y sacarosa se fermentan más fácilmente por *Streptococcus thermophilus* que sus monosacáridos componentes. Solo la porción de glucosa de la molécula de lactosa se fermenta por *Streptococcus thermophilus* y se acumula galactosa en los productos lácteos fermentados cuando se usa *Streptococcus thermophilus*. En yogur, en donde altas concentraciones de ácido limitan la fermentación, permanece galactosa libre mientras que la galactosa libre producida en las fases tempranas de la fabricación de queso suizo se fermenta posteriormente por *Lactobacillus helveticus*. *Lactococcus lactis*, que se encuentra en muchos cultivos iniciadores usados para la fabricación de queso, también es capaz de consumir la galactosa producida por *Streptococcus thermophilus*.

Con el fin de garantizar cepas de *Streptococcus thermophilus* con un rendimiento de crecimiento lo más óptimo posible, los presentes inventores han expuesto cepas fermentadoras de galactosa de *Streptococcus thermophilus* al agente selectivo 2-desoxiglucosa. Normalmente, los mutantes resistentes a 2-desoxiglucosa tienen mutaciones en el gen que codifica para glucocinasa y en genes que codifican para el transporte de glucosa. Los mutantes aislados, CHCC15757, CHCC15887 y CHCC16404, que son resistentes a 2-desoxiglucosa, tienen mutaciones en su gen de glucocinasa (*glcK*). Además de una mutación en el gen de glucocinasa, los presentes inventores encontraron que CHCC16404 tiene una mutación en el codón de terminación en un gen de transportador de glucosa/manosa que podría explicar por qué la glucosa exportada no se transporta nuevamente al interior de las células.

Sorprendentemente, tales mutantes solos son todavía completamente capaces de acidificar la leche, aunque el tiempo de acidificación hasta pH 5 se retrasa 2-5 horas. Por tanto, como tales, son útiles en aplicaciones de leche fermentada y han conservado la capacidad de las cepas madre para coagular la leche, que es característica del yogur. Además, se encontró que los mutantes excretaban más de 5 mg/ml de glucosa, cuando se inoculó leche B al 9,5% con 10^6 - 10^7 UFC/ml de la cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC15757 o CHCC15887 y se fermentó a 40°C durante al menos 20 horas sin la necesidad de aislamiento de mutantes de transportador de glucosa, o cuando se inoculó leche B al 9,5% con sacarosa al 0,05% con 10^6 - 10^7 UFC/ml de la cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC16404 y se fermentó a 40°C durante al menos 20 horas. Al mismo tiempo, permanecen tan solo aproximadamente 10 mg/ml de lactosa y menos de 1,5 mg/ml de lactosa (límite de detección), respectivamente, en la leche fermentada. Por tanto, el uso de tales cepas para producir productos lácteos fermentados puede tener una importancia para personas con intolerancia a la lactosa.

En consecuencia, la leche fermentada final tiene un índice de dulzor interno superior de al menos 2,0 calculado tal como describe Godshall (1988. *Food Technology* 42 (11): 71-78).

El primer aspecto de la presente invención, por tanto, se refiere a una cepa mutante fermentadora de galactosa de *Streptococcus thermophilus*, en la que la cepa mutante porta una mutación en la secuencia de ADN del gen *glcK* que codifica para una proteína glucocinasa, en la que la mutación inactiva parcial o totalmente la proteína glucocinasa codificada o tiene un efecto negativo sobre la expresión del gen haciendo de ese modo que la cepa sea resistente a 2-desoxiglucosa de modo que es capaz de crecer hasta dar una colonia cuando se siembra en estrías sobre una placa de medio M17 que contiene galactosa al 2% (p/v), y 2-desoxiglucosa 20 mM tras incubación a 40°C durante 20 horas. Se conocen fácilmente métodos para medir el nivel de actividad glucocinasa o el nivel de expresión del gen de glucocinasa (Porter *et al.* (1982) *Biochim. Biophys Acta*, 709; 178-186) e incluyen ensayos enzimáticos con kits disponibles comercialmente y transcriptómica o PCR cuantitativa usando materiales que están fácilmente disponibles.

Una "cepa" bacteriana, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una bacteria que permanece genéticamente sin cambios cuando se cultiva o se multiplica. Se incluye una multiplicidad de bacterias idénticas.

El término "cepas de *Streptococcus thermophilus* fermentadoras de galactosa" tal como se usa en el presente

documento se refiere a cepas de *Streptococcus thermophilus* que son capaces de crecer sobre/en medio M17 + galactosa al 2%. Las cepas de *Streptococcus thermophilus* fermentadoras de galactosa se definen en el presente documento como cepas de *Streptococcus thermophilus* que disminuyen el pH del caldo M17 que contiene galactosa al 2% como único hidrato de carbono a 5,5 o menos cuando se inocula a partir de un cultivo durante la noche al 1% y se incuba durante 24 horas a 37°C.

Las cepas fermentadoras de galactosa pueden obtenerse mediante el método descrito en el documento WO 2011/026863.

El término "la mutación inactiva la proteína glucocinasa", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una mutación que da como resultado una "proteína glucocinasa inactivada", una proteína glucocinasa que, si está presente en una célula, no es capaz de ejercer su función normal, así como mutaciones que impiden la formación de la proteína glucocinasa o dan como resultado la degradación de la proteína glucocinasa.

En particular, una proteína glucocinasa inactivada es una proteína que en comparación con una proteína glucocinasa funcional no es capaz de facilitar la fosforilación de glucosa a glucosa-6-fosfato o facilita la fosforilación de glucosa a glucosa-6-fosfato a una tasa significativamente reducida. El gen que codifica para una proteína glucocinasa inactivada de este tipo en comparación con el gen que codifica para una proteína glucocinasa funcional comprende una mutación en el marco de lectura abierto (ORF) del gen, en el que dicha mutación puede incluir, pero no se limita a, una deleción, una mutación de cambio de sentido, introducción de un codón de terminación o una mutación que da como resultado una sustitución de aminoácidos, que cambia las propiedades funcionales de la proteína, o una mutación del promotor que reduce o suprime la transcripción o traducción del gen.

En realizaciones preferidas la mutación reduce la actividad (la tasa de fosforilación de glucosa a glucosa-6-fosfato) de la proteína glucocinasa en al menos el 50%, tal como al menos el 60%, tal como al menos el 70%, tal como al menos el 80%, tal como al menos el 90%.

La actividad glucocinasa puede determinarse mediante los ensayos enzimáticos de glucocinasa tal como describen Pool *et al.* (2006. *Metabolic Engineering* 8;456-464).

El término "proteína glucocinasa funcional" tal como se usa en el presente documento se refiere a una proteína glucocinasa que, si está presente en una célula, facilita la fosforilación de glucosa a glucosa-6-fosfato. En particular, una proteína glucocinasa funcional puede estar codificada por un gen que comprende un ORF que tiene una secuencia correspondiente a las posiciones 1-966 en SEQ ID NO. 1 o una secuencia que tiene al menos el 85% de identidad, tal como al menos el 90% de identidad, tal como al menos el 95% de identidad, tal como al menos el 98% de identidad, tal como al menos el 99% de identidad, con la secuencia correspondiente a las posiciones 1-966 de SEQ ID NO. 1.

El porcentaje de identidad de dos secuencias puede determinarse usando algoritmos matemáticos, tales como el algoritmo de Karlin y Altschul (1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87;2264), el algoritmo modificado descrito en Karlin y Altschul (1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90;5873-5877); el algoritmo de Myers y Miller (1988. *CABIOS* 4;11-17); el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970. *J. Mol. Biol.* 48;443-453); y el algoritmo de Pearson y Lipman (1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85;2444-2448). También está disponible software informático para la determinación de la identidad de secuencia de aminoácidos o ácido nucleico basándose en estos algoritmos matemáticos. Por ejemplo, la comparación de secuencias de nucleótidos puede realizarse con el programa BLASTN, puntuación=100, longitud de palabra=12. La comparación de secuencias de aminoácidos puede realizarse con el programa BLASTX, puntuación=50, longitud de palabra=3. Para los parámetros restantes del programa BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto.

En muchos países, no se acepta el uso de organismos modificados genéticamente (OMG) para productos lácteos fermentados. La presente invención en su lugar proporciona un método de obtención de cepas mutantes inducidas o que se producen de manera natural que pueden proporcionar una acumulación deseable de glucosa en el producto lácteo fermentado.

Por tanto, en una realización muy preferida de la presente invención, la cepa mutante es un mutante que se produce de manera natural o un mutante inducido.

Una "bacteria mutante" o una "cepa mutante" tal como se usa en el presente documento se refiere a una bacteria mutante natural (espontánea, que se produce de manera natural) o a una bacteria mutante inducida que comprende una o más mutaciones en su genoma (ADN) que están ausentes en el ADN silvestre. Un "mutante inducido" es una bacteria en la que la mutación se indujo mediante tratamiento por el hombre, tal como tratamiento con mutágenos químicos, radiación UV o con rayos gamma, etc. En cambio, un "mutante espontáneo" o "mutante que se produce de manera natural" no se ha mutagenizado por el hombre. En el presente documento, las bacterias mutantes no son OMG (organismo modificado genéticamente), es decir no modificadas mediante tecnología de ADN recombinante.

"Cepa silvestre" se refiere a la forma no mutada de una bacteria, tal como se encuentra en la naturaleza.

Términos tales como “cepas con propiedades edulcorantes”, “cepas que pueden proporcionar una acumulación deseable de glucosa en el producto lácteo fermentado” y “cepas con propiedades potenciadas para el endulzamiento natural de productos alimenticios” se usan de manera intercambiable en el presente documento para caracterizar un aspecto ventajoso del uso de las de la presente invención en la fermentación de productos lácteos.

5 En una realización preferida, la cepa mutante de *Streptococcus thermophilus* según la invención aumenta la cantidad de glucosa en leche B al 9,5% hasta al menos 5 mg/ml cuando se inocula en la leche B al 9,5% a una concentración de 10^6 - 10^7 UFC/ml y se hace crecer a 40°C durante al menos 20 horas.

10 En otra realización preferida, la cepa mutante de *Streptococcus thermophilus* según la invención aumenta la cantidad de glucosa en leche B al 9,5% con sacarosa al 0,05% hasta al menos 5 mg/ml cuando se inocula en la leche B al 9,5% con sacarosa al 0,05% a una concentración de 10^6 - 10^7 UFC/ml y se hace crecer a 40°C durante al menos 20 horas.

15 En el presente contexto, leche B al 9,5% es leche hervida preparada con leche en polvo desnatada baja en grasa reconstituida hasta un nivel de materia seca de 9,5% y pasteurizada a 99°C durante 30 min seguido por enfriamiento hasta 40°C.

20 En realizaciones más preferidas de la invención, la cepa mutante conduce a un aumento en la cantidad de glucosa hasta al menos 6 mg/ml, tal como al menos 7 mg/ml, tal como al menos 8 mg/ml, tal como al menos 9 mg/ml, tal como al menos 10 mg/ml, tal como al menos 11 mg/ml, tal como al menos 12 mg/ml, tal como al menos 13 mg/ml, tal como al menos 14 mg/ml, tal como al menos 15 mg/ml, tal como al menos 20 mg/ml, tal como al menos 25 mg/ml.

La cepa mutante de *Streptococcus thermophilus* es resistente a 2-desoxiglucosa.

25 El término “resistente a 2-desoxiglucosa” en el presente documento se define como que una cepa bacteriana mutada particular tiene la capacidad de crecer hasta dar una colonia cuando se siembra en estrías sobre una placa de medio M17 que contiene galactosa al 2% (p/v) y, 2-desoxiglucosa 20 mM tras incubación a 40°C durante 20 horas. La presencia de 2-desoxiglucosa en el medio de cultivo impedirá el crecimiento de cepas no mutadas mientras que el crecimiento de las cepas mutadas no se ve afectado o no se ve afectado significativamente. Las cepas no mutadas que pueden usarse como cepas de referencia sensibles en la evaluación de la resistencia incluyen preferiblemente las cepas CHCC14994 y CHCC11976.

35 Los ejemplos 1 y 2 en el presente documento ejemplifican el aislamiento de cepas mutantes de *Streptococcus thermophilus* que son resistentes a 2-desoxiglucosa.

40 En aún otra realización, la cepa mutante según la invención puede caracterizarse por su patrón de crecimiento. Esto se ilustra por el hallazgo de que la tasa de crecimiento de la cepa mutante es mayor en medio M17+galactosa al 2% que en medio M17+glucosa al 2%. La tasa de crecimiento se mide como el desarrollo de densidad óptica del cultivo en crecimiento exponencial a 600 nanómetros (DO_{600}) con el tiempo tal como se describe en el ejemplo 2 en el presente documento.

45 En una realización preferida, la tasa de crecimiento es al menos el 5% mayor, tal como al menos el 10% mayor, tal como al menos el 15% mayor, tal como al menos el 20% mayor, en medio M17+galactosa al 2% que en medio M17+glucosa al 2%.

En una realización preferida, la mutación da como resultado el reemplazo del codón que codifica para serina por el codón que codifica para prolina en la posición 72 en SEQ ID NO. 2. Preferiblemente la mutación en el gen *glcK* da como resultado el reemplazo de una T por una C en la posición 214 en SEQ ID NO. 1.

50 En otra realización preferida, la mutación da como resultado el reemplazo del codón que codifica para treonina por el codón que codifica para isoleucina en la posición 141 en SEQ ID NO. 2.

Preferiblemente, la mutación en el gen *glcK* da como resultado el reemplazo de una C por una T en la posición 422 en SEQ ID NO. 1.

55 Debe resaltarse que el gen *glcK* de una *Streptococcus thermophilus* puede inactivarse mediante otros tipos de mutaciones en otros sitios del gen *glcK*.

60 En una realización preferida, la cepa de *Streptococcus thermophilus* porta una mutación que reduce el transporte de glucosa al interior de la célula.

65 El término “una mutación que reduce el transporte de glucosa al interior de la célula” tal como se usa en el presente documento se refiere a una mutación en un gen que codifica para una proteína implicada en el transporte de glucosa que da como resultado una acumulación de glucosa en el entorno de la célula. El nivel de glucosa en el medio de cultivo de una cepa de *Streptococcus thermophilus* puede medirse fácilmente mediante métodos conocidos por el experto y tal como se describe en el ejemplo 4 en el presente documento también cuando el medio de cultivo es un

sustrato lácteo.

En realizaciones preferidas, la mutación reduce el transporte de glucosa al interior de la célula en al menos el 50%, tal como al menos el 60%, tal como al menos el 70%, tal como al menos el 80%, tal como al menos el 90%.

El transporte de glucosa al interior de la célula puede determinarse mediante el ensayo de captación de glucosa descrito por Cochu *et al.* (2003. Appl Environ Microbiol 69(9); 5423-5432).

Preferiblemente, la cepa de *Streptococcus thermophilus* porta una mutación en un gen que codifica para un componente de un transportador de glucosa, en el que la mutación inactiva la proteína transportadora de glucosa o tiene un efecto negativo sobre la expresión del gen.

El componente puede ser cualquier componente de una proteína transportadora de glucosa que es crítico para el transporte de glucosa. Por ejemplo, se contempla que la inactivación de cualquier componente de la glucosa/manosa PTS en *Streptococcus thermophilus* representada en la figura 3 dará como resultado la inactivación de la función del transportador de glucosa.

El término "la mutación inactiva el transportador de glucosa" tal como se usa en el presente documento se refiere a una mutación que da como resultado un "transportador de glucosa inactivado", una proteína transportadora de glucosa que, si está presente en una célula, no es capaz de ejercer su función normal, así como mutaciones que impiden la formación de la proteína transportadora de glucosa o dan como resultado la degradación de la proteína transportadora de glucosa.

En particular, una proteína transportadora de glucosa inactivada es una proteína que en comparación con una proteína transportadora de glucosa funcional no es capaz de facilitar el transporte de glucosa a través de una membrana plasmática o facilita el transporte de glucosa a través de una membrana plasmática a una tasa significativamente reducida. El gen que codifica para una proteína transportadora de glucosa inactivada de este tipo en comparación con el gen que codifica para una proteína transportadora de glucosa funcional comprende una mutación en el marco de lectura abierto (ORF) del gen, en el que dicha mutación puede incluir, pero no se limita a, una delección, una mutación de cambio de sentido, la introducción de un codón de terminación o una mutación que da como resultado una sustitución de aminoácido, que cambia las propiedades funcionales de la proteína, o una mutación de promotor que reduce o suprime la transcripción o traducción del gen.

En realizaciones preferidas la mutación reduce la actividad (la tasa de transporte de glucosa) de la proteína transportadora de glucosa en al menos el 50%, tal como al menos el 60%, tal como al menos el 70%, tal como al menos el 80%, tal como al menos el 90%.

La actividad del transportador de glucosa puede determinarse mediante el ensayo de captación de glucosa tal como describen Cochu *et al.* (2003. Appl Environ Microbiol 69(9); 5423-5432).

El término "proteína transportadora de glucosa funcional" tal como se usa en el presente documento se refiere a una proteína transportadora de glucosa que, si está presente en una célula, facilita el transporte de glucosa a través de una membrana plasmática.

Más preferiblemente, la cepa de *Streptococcus thermophilus* porta una mutación en la secuencia de ADN del gen *manM* que codifica para la proteína IIC^{Man} del sistema de glucosa/manosa fosfotransferasa, en el que la mutación inactiva la proteína IIC^{Man} o tiene un efecto negativo sobre la expresión del gen.

En una realización incluso más preferida, la mutación da como resultado el reemplazo del codón que codifica para ácido glutámico con un codón de terminación en la posición 209 de SEQ ID NO. 6 de la proteína IIC^{Man} del sistema de glucosa/manosa fosfotransferasa. Preferiblemente, la mutación da como resultado el reemplazo de una G por una T en la posición 625 de SEQ ID NO. 5.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus* seleccionada del grupo que consiste en la cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC15757 que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número de registro DSM 25850, una cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC15887 que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número de registro DSM 25851, la cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC16404 que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número de registro DSM 26722.

En el presente contexto, el término "cepas derivadas de la misma" debe entenderse como cepas derivadas, o cepas que pueden derivarse de una cepa (o su cepa madre) de la invención por medio de, por ejemplo, ingeniería genética, radiación y/o tratamiento químico. Las "cepas derivadas de la misma" también pueden ser mutantes que se producen espontáneamente. Se prefiere que las "cepas derivadas de la misma" sean mutantes funcionalmente equivalentes, por ejemplo, mutantes que tienen sustancialmente las mismas propiedades, o mejoradas, (por ejemplo, con respecto a la excreción de glucosa) como su cepa madre. Tales "cepas derivadas de la misma" son parte de la presente

invención. Especialmente, el término “cepas derivadas de la misma” se refiere a cepas obtenidas sometiendo una cepa de la invención a cualquier tratamiento de mutagenización convencionalmente usado incluyendo tratamiento con un mutágeno químico tal como etanometanosulfonato (EMS) o N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG), luz UV; o a un mutante que se produce espontáneamente. Un mutante puede haberse sometido a varios tratamientos de mutagenización (un único tratamiento debe entenderse como una etapa de mutagenización seguido por una etapa de cribado/selección), pero se prefiere en el presente documento que se lleven a cabo no más de 20, o no más de 10 o no más de 5 tratamientos (o etapas de cribado/selección). En un mutante preferido en el presente documento menos del 1%, menos del 0,1%, menos del 0,01%, menos del 0,001% o incluso menos del 0,0001% de los nucleótidos en el genoma bacteriano se han reemplazado por otro nucleótido, o delecionado, en comparación con la cepa madre.

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* es una bacteria del ácido láctico que se emplea frecuentemente para fermentación de leche comercial en donde el organismo se usa normalmente como parte de un cultivo iniciador mixto.

La lactosa se fermenta más fácilmente que los monosacáridos glucosa, fructosa y manosa por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y las cepas de esta especie normalmente no crecen sobre galactosa (Buchanan R.E., Gibbons N.E., eds (1974): *Bergey's manual of determinative bacteriology* (The Williams & Wilkins Co. Baltimore, Md), 8ª ed.). Durante la fermentación de lactosa por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, solo la porción de glucosa de las moléculas de lactosa se fermenta y por tanto se acumula galactosa en productos lácteos fermentados.

Con el fin de obtener cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que sean incapaces de crecer sobre glucosa como fuente de carbono, los presentes inventores han expuesto cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a 2-desoxiglucosa. Los mutantes aislados eran resistentes a 2-desoxiglucosa y capaces de crecer en un sustrato lácteo sin usar glucosa como fuente de carbono. Se encontró que los mutantes aumentaban el contenido en glucosa de la leche. Por consiguiente, los productos lácteos fermentados producidos mediante el uso de estas cepas se caracterizan por una mayor cantidad de glucosa, lo que hace que los productos tengan un sabor más dulce.

Sorprendentemente, las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* de la invención solas son todavía completamente capaces de acidificar la leche, aunque el tiempo de acidificación hasta pH 5 se retrase 2-5 horas. Adicionalmente, tal como se demuestra en los ejemplos, se encontró que las cepas excretaban aproximadamente 5 mg/ml o más de glucosa al tiempo que permanecían menos de aproximadamente 10 mg/ml de lactosa en la leche fermentada cuando se inoculó leche B al 9,5% con 10^6 - 10^7 UFC/ml de una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según la invención y se fermentó con la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según la invención a 40°C durante al menos 20 horas. Por tanto, el uso de tales cepas para producir productos lácteos fermentados puede tener importancia para personas con intolerancia a la lactosa.

En consecuencia, la leche fermentada final tiene un índice de dulzor interno mayor de aproximadamente 2 o más calculado tal como describe Godshall (1988. *Food Technology* 42(11):71-78), tal como 2,5 o más o tal como 3 o más.

El tercer aspecto de la presente invención se refiere a una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que está comprendida adicionalmente en la composición del quinto aspecto de la presente invención, en el que dicha cepa es resistente a 2-desoxiglucosa.

El término “resistente a 2-desoxiglucosa” en relación con una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se define como que una cepa bacteriana particular tiene la capacidad de crecer hasta dar una colonia tras incubación a 40°C durante 20 horas cuando se siembra en estrías sobre una placa de medio MRS-IM que contiene lactosa al 2% y 2-desoxiglucosa 20 mM. La presencia de 2-desoxiglucosa en el medio de cultivo impedirá el crecimiento de cepas no resistentes al tiempo que el crecimiento de cepas resistentes no se ve afectado o no se ve afectado significativamente. Las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* no resistentes que pueden usarse como cepas de referencia sensibles en la evaluación de la resistencia incluyen las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC759, que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de registro DSM 26419 y CHCC10019, que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el n.º de registro DSM 19252.

En el caso de que las placas de agar MRS-IM que contienen lactosa al 2% y que contienen además 2-desoxiglucosa 20 mM estén desbordadas de colonias, resulta apropiado aumentar la concentración de 2-desoxiglucosa en las placas, por ejemplo, hasta 30 mM o incluso 40 mM o más. En el caso de que no se obtengan colonias, resulta apropiado disminuir la concentración de 2-desoxiglucosa en las placas, por ejemplo, hasta 15 mM o 10 mM o incluso menos. Si se considera necesario, la tasa de mutación puede potenciarse usando protocolos de mutagénesis física o química apropiados.

Preferiblemente, la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* de la invención aumenta la cantidad de glucosa en leche B al 9,5% hasta al menos 5 mg/ml cuando se inocula en la leche B al 9,5% a una concentración de 10^6 a 10^7 UFC/ml y se hace crecer a 40°C durante al menos 20 horas, tal como durante entre 20 y 30 horas, tal como durante 20 horas.

En realizaciones más preferidas de la invención, la cepa mutante conduce a un aumento en la cantidad de glucosa

hasta al menos 6 mg/ml, tal como al menos 7 mg/ml, tal como al menos 8 mg/ml, tal como al menos 9 mg/ml, tal como al menos 10 mg/ml, tal como al menos 11 mg/ml, tal como al menos 12 mg/ml, tal como al menos 13 mg/ml, tal como al menos 14 mg/ml, tal como al menos 15 mg/ml.

5 Un cuarto aspecto de la invención se refiere a una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que se selecciona del grupo que consiste en la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159, que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de registro DSM26420, la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160, que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de registro DSM26421, y cepas derivadas
10 de las mismas, en las que las cepas están comprendidas además en la composición del quinto aspecto de la presente invención.

El término "cepas derivadas de las mismas" debe entenderse tal como se definió anteriormente.

15 Por consiguiente, en una realización preferida la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se selecciona del grupo que consiste en la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159, que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de registro DSM26420, la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160, que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de registro DSM26421 y una cepa mutante derivada de las
20 mismas, en la que la cepa mutante se obtiene usando una de las cepas depositadas como material de partida, y en la que el mutante ha retenido o mejorado adicionalmente la propiedad de fermentación de lactosa y/o la propiedad y secreción de glucosa de dicha cepa depositada.

25 Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende desde 10^4 hasta 10^{12} UFC (unidades formadoras de colonias)/g de una cepa de *Streptococcus thermophilus* según el primer o segundo aspecto de la invención, tal como desde 10^5 hasta 10^{11} UFC/g, tal como desde 10^6 hasta 10^{10} UFC/g, o tal como desde 10^7 hasta 10^9 UFC/g de la cepa de *Streptococcus thermophilus*.

30 En una realización preferida la cepa de *Streptococcus thermophilus* es incapaz de acidificar leche B al 9,5%, definido como que da como resultado una disminución del pH de menos de 1,0 cuando se inocula leche B al 9,5% con 10^6 - 10^7 UFC/ml de la cepa de *Streptococcus thermophilus* y se incuba durante 14 horas a 40°C, y la composición comprende además una cantidad de un compuesto, que puede desencadenar la acidificación de la leche B al 9,5% mediante la
35 cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC16404 que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número de registro DSM 26722, definido como que da como resultado una disminución del pH de 1,0 o más cuando se inocula leche B al 9,5% con 10^6 - 10^7 UFC/ml de la cepa de *Streptococcus thermophilus* y se incuba durante 14 horas a 40°C.

Preferiblemente, el compuesto es sacarosa.

40 Preferiblemente, la cantidad de sacarosa es de desde el 0,000001% hasta el 2%, tal como desde el 0,00001% hasta el 0,2%, tal como desde el 0,0001% hasta el 0,1%, tal como desde el 0,001% hasta el 0,05%.

45 En una realización especialmente preferida, la composición comprende además desde 10^4 hasta 10^{12} UFC/g de una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según la invención, tal como desde 10^5 hasta 10^{11} UFC/g, tal como desde 10^6 hasta 10^{10} UFC/g, o tal como desde 10^7 hasta 10^9 UFC/g de la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

50 Una composición preferida de la presente invención comprende, por ejemplo, la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159 y/o la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160 en combinación con la cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC15757. Una composición preferida adicional comprende la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159 y/o *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160 en combinación con la cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC15887. Una composición preferida incluso adicional
55 comprende la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159 y/o *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160 en combinación con la cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC16404.

60 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* y otras bacterias del ácido láctico se usan comúnmente como cultivos iniciadores que sirven para un fin tecnológico en la producción de diversos alimentos, tal como en la industria láctea, tal como para productos lácteos fermentados. Por tanto, en otra realización preferida la composición es adecuada como cultivo iniciador.

Los cultivos iniciadores pueden proporcionarse como cultivos iniciadores congelados o secados además de cultivos iniciadores líquidos. Por tanto, en aún otra realización preferida la composición está en forma congelada, secada por congelación o líquida.

65 Tal como se da a conocer en el documento WO 2005/003327, es beneficioso añadir determinados agentes crioprotectores a un cultivo iniciador. Por tanto, una composición de cultivo iniciador según la presente invención puede

comprender uno o más agentes crioprotectores seleccionados del grupo que consiste en inosina-5'-monofosfato (IMP), adenosina-5'-monofosfato (AMP), guanosina-5'-monofosfato (GMP), uranosina-5'-monofosfato (UMP), citidina-5'-monofosfato (CMP), adenina, guanina, uracilo, citosina, adenosina, guanosina, uridina, citidina, hipoxantina, xantina, hipoxantina, orotidina, timidina, inosina y un derivado de cualquiera de tales compuestos.

5 Un sexto aspecto de la invención se refiere a un método para producir un producto lácteo fermentado que comprende inocular y fermentar un sustrato lácteo con al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* según el primer o segundo aspecto de la presente invención.

10 El término "leche" ha de entenderse como la secreción láctea obtenida por el ordeño de cualquier mamífero, tal como una vaca, una oveja, una cabra, un búfalo o un camello. En una realización preferida, la leche es leche de vaca.

15 El término "sustrato lácteo" puede ser cualquier material lácteo procesado y/o sin procesar que puede someterse a fermentación según el método de la invención. Por tanto, los sustratos lácteos útiles incluyen, pero no se limitan a, disoluciones/suspensiones de cualquier producto lácteo o producto similar a la leche que comprende proteína, tal como leche entera o baja en grasa, leche desnatada, suero de leche, leche en polvo reconstituida, leche condensada, leche en polvo, suero, permeado de suero, lactosa, líquido madre de la cristalización de lactosa, concentrado de proteína de suero o nata. Obviamente, el sustrato lácteo puede originarse de cualquier mamífero, siendo por ejemplo

20 leche de mamífero sustancialmente pura o leche en polvo reconstituida. Preferiblemente, al menos parte de la proteína en el sustrato lácteo son proteínas que se producen de manera natural en la leche, tales como caseína o proteína de suero. Sin embargo, parte de la proteína pueden ser proteínas que no se producen de manera natural en la leche.

25 Antes de la fermentación, el sustrato lácteo puede homogeneizarse y pasteurizarse según métodos conocidos en la técnica.

30 "Homogeneización" tal como se usa en el presente documento significa mezclado intensivo para obtener una suspensión o emulsión soluble. Si la homogeneización se realiza antes de la fermentación, puede realizarse para romper la grasa de la leche en tamaños más pequeños de modo que ya no se separe de la leche. Esto puede lograrse forzando la leche a alta presión a través de orificios pequeños.

35 "Pasteurización" tal como se usa en el presente documento significa el tratamiento del sustrato lácteo para reducir o eliminar la presencia de organismos vivos, tales como microorganismos. Preferiblemente, la pasteurización se logra manteniendo una temperatura especificada durante un periodo de tiempo especificado. La temperatura especificada se logra habitualmente mediante calentamiento. La temperatura y la duración pueden seleccionarse con el fin de destruir o inactivar determinadas bacterias, tales como bacterias perjudiciales. Puede seguir una etapa de enfriamiento rápido.

40 "Fermentación" en los métodos de la presente invención significa la conversión de hidratos de carbono en alcoholes o ácidos a través de la acción de un microorganismo. Preferiblemente, la fermentación en los métodos de la invención comprende la conversión de lactosa en ácido láctico.

45 Los procesos de fermentación que van a usarse en la producción de productos lácteos fermentados se conocen bien y el experto en la técnica sabrá cómo seleccionar condiciones adecuadas del proceso, tales como temperatura, oxígeno, cantidad y características de microorganismo(s) y tiempo de proceso. Obviamente, las condiciones de fermentación se seleccionan para apoyar el logro de la presente invención, es decir, para obtener un producto lácteo en forma sólida o líquida (producto lácteo fermentado).

50 El término "producto lácteo fermentado" tal como se usa en el presente documento se refiere a un producto alimenticio o de alimentación en el que la preparación del producto alimenticio o de alimentación implica la fermentación de un sustrato lácteo con bacterias del ácido láctico. "Producto lácteo fermentado" tal como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, productos tales como yogur, queso, nata agria y suero de leche, así como suero fermentado.

55 En una realización preferida, la concentración de células de *Streptococcus thermophilus* inoculadas es de desde 10^4 hasta 10^9 UFC de células de *Streptococcus thermophilus* por ml de sustrato lácteo, tal como desde 10^4 UFC hasta 10^8 UFC de células de *Streptococcus thermophilus* por ml de sustrato lácteo.

60 En otra realización preferida, la cepa de *Streptococcus thermophilus* es incapaz de acidificar la leche B al 9,5%, definido como que da como resultado una disminución del pH de menos de 1,0 cuando se inocula leche B al 9,5% con 10^6 - 10^7 UFC/ml de la cepa de *Streptococcus thermophilus* y se incuba durante 14 horas a 40°C, y se añade al sustrato lácteo una cantidad de un compuesto, eficaz para desencadenar la acidificación de leche B al 9,5% mediante la cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC16404 que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número de registro DSM 26722, definido como que da como resultado una disminución del pH de 1,0 o más cuando se inocula leche B al 9,5% con 10^6 - 10^7 UFC/ml de la cepa de *Streptococcus thermophilus* y se incuba

durante 14 horas a 40°C.

Preferiblemente, el compuesto es sacarosa.

- 5 Preferiblemente, la cantidad de sacarosa es de desde el 0,000001% hasta el 2%, tal como desde el 0,00001% hasta el 0,2%, tal como desde el 0,0001% hasta el 0,1%, tal como desde el 0,001% hasta el 0,05%.

10 Un séptimo aspecto de la invención se refiere a un método para producir un producto lácteo fermentado que comprende inocular y fermentar un sustrato lácteo con la composición según el quinto aspecto de la presente invención.

15 En una realización preferida, la concentración de células de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* inoculadas es de desde 10^4 hasta 10^9 UFC de células de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* por ml de sustrato lácteo, tal como desde 10^4 UFC hasta 10^8 UFC de células de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* por ml de sustrato lácteo.

20 En una realización preferida, el método para producir el producto lácteo fermentado comprende inocular y fermentar un sustrato lácteo con al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* según la presente invención y al menos una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según la presente invención.

En otra realización preferida el producto lácteo fermentado es un yogur o un queso.

25 Los ejemplos de quesos que se preparan mediante fermentación con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* incluyen queso mozzarella y de pizza (Høier *et al.* (2010) en *The Technology of Cheesemaking*, 2ª Ed. Blackwll Publishing, Oxford; 166-192).

Preferiblemente, el producto lácteo fermentado es un yogur.

30 En el presente contexto, un cultivo iniciador de yogur es un cultivo bacteriano que comprende al menos una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus*. Según lo mismo, el término "yogur" se refiere a un producto lácteo fermentado obtenible inoculando y fermentando leche con una composición que comprende una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y una cepa de *Streptococcus thermophilus*.

35 En un octavo aspecto la presente invención se refiere a un producto lácteo fermentado obtenible mediante el método según el sexto o séptimo aspecto de la invención.

40 En un noveno aspecto la presente invención se refiere a un producto lácteo fermentado que comprende al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* según el primer o segundo aspecto de la invención.

En un décimo aspecto la presente invención se refiere a un producto lácteo fermentado que comprende la composición según el quinto aspecto de la invención.

45 En una realización preferida, el producto lácteo fermentado comprende al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* según la invención y al menos una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según la invención.

50 En otra realización preferida, el producto lácteo fermentado es un yogur o un queso. Preferiblemente, el producto lácteo fermentado es un yogur.

En un decimoprimer aspecto la presente invención se refiere al uso de una cepa de *Streptococcus thermophilus* según el primer o segundo aspecto de la invención para la preparación de un producto lácteo fermentado.

55 En un duodécimo aspecto la presente invención se refiere al uso de una composición según el quinto aspecto de la invención para la preparación de un producto lácteo fermentado.

60 Un decimotercer aspecto de la presente invención se refiere al uso de una cepa de *Streptococcus thermophilus* según la invención y una *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según la invención para la preparación de un producto lácteo fermentado.

Un decimocuarto aspecto se refiere al uso de una cepa de *Streptococcus thermophilus* según el primer o segundo aspecto de la invención para aumentar el dulzor de un producto lácteo fermentado.

65 En un decimoquinto aspecto la presente invención se refiere al uso de una composición según el quinto aspecto de la invención para aumentar el dulzor de un producto lácteo fermentado.

En un decimosexto aspecto la presente invención se refiere al uso de una cepa de *Streptococcus thermophilus* según el primer o segundo aspecto de la invención y una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según el tercer y cuarto aspecto de la invención para aumentar el dulzor de un producto lácteo fermentado.

5 Especialmente, los niños como grupo de consumidores tienen una preferencia por productos alimenticios de sabor dulce y se contempla que la cepa de *Streptococcus thermophilus* de la invención y la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* de la invención puedan ser particularmente útiles en el aumento del dulzor de un producto lácteo fermentado destinado a niños.

10 Un decimoséptimo aspecto de la presente invención se refiere a un producto lácteo fermentado según la invención para su uso en la reducción de la ingesta de calorías.

Se cree que el producto lácteo fermentado según la invención es especialmente útil en la dieta de personas que padecen sobrepeso u obesidad.

15 Por tanto, en una realización preferida el producto lácteo fermentado según la invención es para su uso en la reducción de la ingesta de calorías de una persona que padece sobrepeso u obesidad.

20 El sobrepeso y la obesidad son estados médicos definidos por la Organización mundial de la salud (OMS) como acumulación de grasa excesiva o anómala que presenta un riesgo para la salud. El índice de masa corporal (IMC) puede usarse como guía aproximada para clasificar el sobrepeso y la obesidad en adultos y se calcula como el peso de una persona en kilogramos dividido entre el cuadrado de su altura en metros (kg/m²). La definición de la OMS establece que un IMC mayor de o igual a 25 es sobrepeso y que un IMC mayor de o igual a 30 es obesidad.

25 Un decimoctavo aspecto de la presente invención se refiere al uso de una cepa de *Streptococcus thermophilus* según el primer o segundo aspecto de la invención para disminuir el contenido en lactosa en un producto lácteo fermentado.

En un decimonoveno aspecto la presente invención se refiere al uso de una composición según el quinto aspecto de la invención para disminuir el contenido en lactosa en un producto lácteo fermentado.

30 Un vigésimo aspecto de la presente invención se refiere al uso de una cepa de *Streptococcus thermophilus* según el primer o segundo aspecto de la invención y una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según el tercer o cuarto aspecto de la invención para disminuir el contenido en lactosa en un producto lácteo fermentado.

35 Un vigesimoprimer aspecto de la presente invención se refiere a un producto lácteo fermentado según la invención para su uso en evitar los síntomas de intolerancia a la lactosa.

Un vigesimosegundo aspecto se refiere a una composición de la invención para su uso como medicamento.

40 En un vigesimotercer aspecto la invención se refiere al uso de una cepa de *Streptococcus thermophilus* según la invención para mejorar el crecimiento de una cepa de *Bifidobacterium*.

45 En una realización preferida, la cepa de *Bifidobacterium* pertenece a una especie seleccionada del grupo que consiste en *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium brevis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium adolescentis* y *Bifidobacterium infantis*, tal como una cepa seleccionada del grupo que consiste en la cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12® depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de registro DSM 15954, la cepa de *Bifidobacterium animalis* depositada en la DSMZ con el n.º de registro DSM 15954, la cepa de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 15953 y la cepa de *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 15955. La cepa de *Bifidobacterium* más preferida es *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12® depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 15954.

50 En un vigesimocuarto aspecto la invención se refiere al uso de una composición según la invención para mejorar el crecimiento de una cepa de *Bifidobacterium*.

55 En una realización preferida, la cepa de *Bifidobacterium* pertenece a una especie seleccionada del grupo que consiste en *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium brevis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium adolescentis* y *Bifidobacterium infantis*, tal como una cepa seleccionada del grupo que consiste en la cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12® depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de registro DSM 15954, la cepa de *Bifidobacterium animalis* depositada en la DSMZ con el n.º de registro DSM 15954, la cepa de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 15953 y la cepa de *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 15955. La cepa de *Bifidobacterium* más preferida es *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12® depositada en la DSMZ con el número de registro DSM 15954.

60 Un vigesimoquinto aspecto se refiere al uso de una cepa de *Streptococcus thermophilus* según la invención y una

cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* según la invención para mejorar el crecimiento de la cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12® que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número de registro DSM 15954.

5 Se usa 2-desoxiglucosa y una determinación del patrón de crecimiento de las bacterias en medio M17+galactosa al 2% en comparación con en medio M17+glucosa al 2% para la selección de bacterias que tienen una mutación en el gen de glucocinasa (*glcK*).

10 En un vigesimosexto aspecto de la presente invención se proporciona un método para cribar y aislar una cepa de *Streptococcus thermophilus* con un gen *glcK* mutado. El método comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar una cepa madre de *Streptococcus thermophilus* fermentadora de galactosa;

15 b) seleccionar y aislar de un conjunto de cepas de *Streptococcus thermophilus* mutantes derivadas de la cepa madre un conjunto de cepas de *Streptococcus thermophilus* mutantes que son resistentes a 2-desoxiglucosa de modo que son capaces de crecer hasta dar una colonia cuando se siembran en estrías sobre una placa de medio M17 que contiene galactosa al 2% (p/v), y 2-desoxiglucosa 20 mM tras incubación a 40°C durante 20 horas; y

20 c) seleccionar y aislar del conjunto de cepas de *Streptococcus thermophilus* mutantes que son resistentes a 2-desoxiglucosa una cepa de *Streptococcus thermophilus* mutante si la tasa de crecimiento de la cepa de *Streptococcus thermophilus* mutante es mayor en medio M17+galactosa al 2% que en medio M17+glucosa al 2%.

25 El término "resistente a 2-desoxiglucosa" en el presente documento se define como que una cepa bacteriana mutada particular tiene la capacidad de crecer hasta dar una colonia cuando se siembra en estrías sobre una placa de medio M17 que contiene galactosa al 2% y que contiene 2-desoxiglucosa 20 mM tras incubación a 40°C durante 20 horas. La presencia de 2-desoxiglucosa en el medio de cultivo impedirá el crecimiento de cepas no mutadas al tiempo que el crecimiento de las cepas mutadas no se ve afectado o no se ve afectado significativamente. Las cepas no mutadas que pueden usarse como cepas de referencia sensibles en la evaluación de la resistencia incluyen las cepas CHCC14994 y CHCC11976.

30 Los ejemplos 1 y 2 en el presente documento ejemplifican el aislamiento de cepas mutantes de *Streptococcus thermophilus* que son resistentes a 2-desoxiglucosa.

35 En una realización preferida, el comprende además la etapa a1) someter la cepa madre a mutagenización, tal como someter la cepa madre a un mutágeno químico y/o físico.

40 En otra realización preferida, el método comprende además una etapa d) seleccionar y aislar de un conjunto de cepas de *Streptococcus thermophilus* resistentes a 2-desoxiglucosa derivadas de la cepa de *Streptococcus thermophilus* seleccionada en la etapa c) una cepa de *Streptococcus thermophilus* si la tasa de crecimiento de la cepa de *Streptococcus thermophilus* es alta en medio M17+sacarosa al 2% pero de cero o al menos reducida en un 0-50% en comparación con la tasa de crecimiento de la cepa madre en medio M17+glucosa al 2%.

45 Las cepas madre de *Streptococcus thermophilus* fermentadoras de galactosa son capaces de crecer sobre/en medio M17+ galactosa al 2% y se definen en el presente documento como que tienen la capacidad de disminuir el pH en caldo M17 que contiene galactosa al 2% como único hidrato de carbono hasta 5,5 o menos cuando se inoculan a partir de un cultivo al 1% durante la noche y se incuban durante 24 horas a 37°C. Tales cepas positivas para galactosa se han descrito en la técnica anterior y el documento WO2011/026863 (Chr. Hansen A/S) describe un método para obtener tales cepas.

50 En una realización muy preferida la cepa madre se selecciona del grupo que consiste en la cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC14994 que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número de registro DSM 25838, la cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC11976 que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número de registro DSM 22934, y cepas derivadas de las mismas.

55 En el presente contexto, el término "cepas derivadas de las mismas" debe entenderse como cepas derivadas, o cepas que pueden derivarse de cepas madre de *Streptococcus thermophilus* fermentadoras de galactosa por medio de, por ejemplo, ingeniería genética, radiación y/o tratamiento químico. Las "cepas derivadas de las mismas" pueden ser también mutantes que se producen espontáneamente. Se prefiere que las "cepas derivadas de las mismas" sean mutantes funcionalmente equivalentes, por ejemplo, mutantes que tienen sustancialmente las mismas propiedades, o mejoradas (por ejemplo, con respecto a la fermentación de galactosa) que su cepa madre. Tales "cepas derivadas de las mismas" son parte de la presente invención. Especialmente, el término "cepas derivadas de las mismas" se refiere a cepas obtenidas sometiendo una cepa de la invención a cualquier tratamiento de mutagenización convencionalmente usado que incluye el tratamiento con un mutágeno químico tal como etanometanosulfonato (EMS) o N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG), luz UV, o a un mutante que se produce espontáneamente. Un mutante puede haberse sometido a varios tratamientos de mutagenización (un único tratamiento debe entenderse como una etapa de

mutagenización seguida por una etapa de cribado/selección), pero se prefiere en el presente documento que se lleven a cabo no más de 20, o no más de 10, o no más de 5 tratamientos (o etapas de cribado/selección). En un mutante preferido en el presente documento, menos del 1%, menos del 0,1%, menos del 0,01%, menos del 0,001% o incluso menos del 0,0001% de los nucleótidos en el genoma bacteriano se han reemplazado por otro nucleótido, o delecionado, en comparación con la cepa madre.

En un vigesimoséptimo aspecto una cepa de *Streptococcus thermophilus* mutante obtenible mediante el método según el vigesimoséptimo aspecto está comprendida en el presente documento.

Un aspecto de la presente divulgación es un método para cribar y aislar una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* con un metabolismo alterado de la glucosa. El método comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar una cepa madre de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*;

b) seleccionar y aislar de un conjunto de cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mutantes derivadas de la cepa madre un conjunto de cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que son resistentes a 2-desoxiglucosa; y

c) seleccionar y aislar del conjunto de cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que son resistentes a 2-desoxiglucosa una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* si la tasa de crecimiento de la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* es mayor en medio MRS-IM+lactosa al 2% que en medio MRS-IM+glucosa al 2%.

El aislamiento de cepas mutantes de cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que son resistentes a 2-desoxiglucosa se describe en detalle en los ejemplos. Basándose en el ensayo de selección de resistencia a 2-desoxiglucosa del ejemplo 5, el experto puede someter a prueba de manera rutinaria una cepa específica de interés (por ejemplo, una de un producto comercial relevante) si esta cepa específica de interés tiene la resistencia relevante en el presente documento a 2-desoxiglucosa. Basándose el patrón de crecimiento del mutante con resistencia a 2-desoxiglucosa del ejemplo 6, el experto puede someter a prueba de manera rutinaria una cepa específica de interés (por ejemplo, una de un producto comercial relevante) para determinar si esta cepa específica de interés tiene el patrón de crecimiento relevante que es una propiedad de los mutantes seleccionados.

En una realización preferida de la divulgación, el método comprende además la etapa a1) someter la cepa madre a mutagenización, tal como someter la cepa madre a un mutágeno químico y/o físico.

Las cepas madre de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* son capaces de crecer sobre/en medio MRS-IM + lactosa al 2% y se definen en el presente documento como que tienen la capacidad de disminuir el pH en caldo MRS-IM que contiene lactosa al 2% como único hidrato de carbono hasta 5,5 o menos cuando se inoculan a partir de un cultivo durante la noche al 1% y se incuban durante 24 horas a 37°C.

En una realización muy preferida de la divulgación, la cepa madre se selecciona del grupo que consiste en la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC759 que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número de registro DSM 26419, la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC10019 que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número de registro DSM 19252, y cepas derivadas de las mismas.

En el presente documento se describe una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* obtenible mediante el método según el vigesimooctavo aspecto.

A continuación se describen realizaciones de la presente invención, a modo de ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Materiales y métodos

Medio:

Para *Streptococcus thermophilus*, el medio usado es el medio M17 conocido por los expertos en la técnica.

El medio de agar M17 tiene la siguiente composición por litro de H₂O:

agar, 12,75 g

ácido ascórbico, 0,5 g

peptona de caseína (tríptica), 2,5 g

5 β -glicerofosfato de disodio pentahidratado, 19 g
 sulfato de magnesio hidratado, 0,25 g
 extracto de carne, 5 g
 peptona de carne (péptica), 2,5 g
 10 peptona de soja (papaínica), 5 g
 extracto de levadura, 2,5 g
 pH final 7,1 \pm 0,2 (25°C)
 15 y el caldo M17 tiene la siguiente composición por litro de H₂O:

20 ácido ascórbico, 0,5 g
 sulfato de magnesio, 0,25 g
 extracto de carne, 5 g
 peptona de carne (péptica), 2,5 g
 25 glicerofosfato de sodio, 19 g
 peptona de soja (papaínica), 5 g
 30 triptona, 2,5 g
 extracto de levadura, 2,5 g
 pH final 7,0 \pm 0,2 (25°C)
 35

Las fuentes de carbono añadidas son lactosa 20 g/l, glucosa 20 g/l o galactosa 20 g/l estéril.

40 Tal como conoce el experto, el medio M17 es un medio que se considera que es adecuado para el crecimiento de *Streptococcus thermophilus*. Además, tal como entiende el experto, en el presente contexto, puede suministrarse un concentrado de M17 de diferentes proveedores e independientemente del proveedor específico se conseguirá (dentro de la incertidumbre de medición convencional) el mismo resultado relevante en el presente documento de resistencia a 2-desoxiglucosa para una célula de interés relevante en el presente documento.

45 El medio usado para cultivar *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fue medio MRS-IM. Se usó MRS-IM o bien en forma de placas de agar o bien de caldo.

El medio de agar MRS-IM tenía la siguiente composición por litro de H₂O:

Triptona	Oxoid L 42	10,0 g
Extracto de levadura	Oxoid L 21	5,0 g
Tween 80	N.º de Merck 8.22187	1,0 g
K ₂ HPO ₄	N.º de Merck 105104	2,6 g
Acetato de Na	N.º de Merck 106267	5,0 g
Hidrogenocitrato de diamonio	N.º de Merck 101154	2,0 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	N.º de Merck 105882	0,2 g
MnSO ₄ , H ₂ O	N.º de Merck 105941	0,05 g
Agar	SO-BI-GEL	13,0 g

50 Se ajustó el pH tras la esterilización en autoclave a 6,9 \pm 0,1 a 25°C.

El caldo MRS-IM usado en los ejemplos a continuación para cultivos líquidos tenía la siguiente composición por litro de H₂O:

ES 2 765 177 T5

Triptona	Oxoid L 42	10,0 g
Extracto de levadura	Oxoid L 21	5,0 g
Tween 80	N.º de Merck 8.22187	1,0 g
K ₂ HPO ₄	N.º de Merck 105104	2,6 g
Acetato de Na	N.º de Merck 106267	5,0 g
Hidrogenocitrato de diamonio	N.º de Merck 101154	2,0
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	N.º de Merck 105882	0,2 g
MnSO ₄ , H ₂ O	N.º de Merck 105941	0,05 g

El pH se ajusta tras la esterilización en autoclave a $6,9 \pm 0,1$ a 25°C. Las fuentes de carbono, lactosa 20 g/l o glucosa 20 g/l, se esterilizaron por filtración en primer lugar y luego se añadieron al caldo esterilizado en autoclave.

5 Los medios MRS-IM anteriores pueden variarse en algún grado sin afectar a la capacidad de los medios para soportar el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Además, tal como entenderá el experto, puede obtenerse un concentrado de MRS-IM o los diversos componentes descritos anteriormente de diferentes proveedores y usarse para la preparación de un medio MRS-IM. Estos medios se usarán asimismo en los ejemplos a continuación, en particular en el ensayo de selección de resistencia a 2-desoxiglucosa.

10 *Cepas madre*
Streptococcus thermophilus CHCC11976 (cepa fermentadora de galactosa con una mutación en el gen *GalK* y que produce exopolisacáridos tal como se describe en el documento WO 2011/026863).

15 *Streptococcus thermophilus* CHCC14994 (cepa fermentadora de galactosa).

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* CHCC759.

20 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC10019.

Cepas resistentes a 2-desoxi-glucosa

25 *Streptococcus thermophilus* CHCC15757 (mutante resistente a 2-desoxiglucosa de CHCC14994).

Streptococcus thermophilus CHCC15887 (mutante resistente a 2-desoxiglucosa de CHCC11976).

Streptococcus thermophilus CHCC16404 (mutante hiperfermentador de lactosa y secretor de glucosa de CHCC15757).

30 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159 (mutante resistente a 2-desoxiglucosa de CHCC759).

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* CHCC16160 (mutante resistente a 2-desoxiglucosa de CHCC10019).

35 EJEMPLO 1: *Uso de 2-desoxiglucosa para aislar mutantes de glucosa cinasa de Streptococcus thermophilus con excreción de glucosa potenciada.*

40 Con el fin de aislar mutantes de la cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC11976 y de la cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC14994, se inocularon células derivadas del crecimiento de una única colonia en 10 ml de caldo M17 que contiene lactosa al 2% y se hicieron crecer durante la noche a 40°C.

45 El día siguiente, se sembraron en placa las cepas en diluciones en serie sobre placas de agar M17 que contienen galactosa al 2% y una concentración de 2-desoxiglucosa de o bien 20 mM (CHCC14994) o bien 30 mM (CHCC11976) y se incubaron durante 20 horas a 40°C. En primer lugar, las colonias resistentes volvieron a sembrarse en estrías sobre el mismo tipo de placas de agar que en las que se seleccionaron. Se usaron los supervivientes para inocular caldo M17 nuevo que contenía o bien lactosa al 2%, galactosa al 2% o bien glucosa al 2% y se midió el crecimiento.

50 A partir de esto, se identificaron varios mutantes que eran capaces de crecer más rápido sobre galactosa que sobre glucosa tal como se explica resumidamente en el ejemplo 2. Dos de tales mutantes eran CHCC15757 y CHCC15887, que se derivaban de CHCC14994 y CHCC11976 respectivamente.

EJEMPLO 2: *Patrón de crecimiento de mutantes con resistencia a 2-desoxiglucosa*

55 Para garantizar la selección de mutantes resistentes a 2-desoxiglucosa que pueden crecer sobre galactosa, se usaron dos cepas que se seleccionaron de una colección de cepas fermentadoras de galactosa. Aunque estas cepas

fermentadoras de galactosa todavía crecen al menos el 10% más rápido en fase exponencial en caldo M17+glucosa al 2% que en caldo M17+galactosa al 2%, los derivados mutantes resistentes a 2-desoxiglucosa de CHCC11976 y CHCC14994, tales como CHCC15757 y CHCC15887, por otro lado, se caracterizan por crecer más rápido en fase exponencial en caldo M17+galactosa al 2% que en caldo M17+glucosa al 2%.

El crecimiento en fase exponencial se mide en el presente documento como el desarrollo en densidad óptica del cultivo en crecimiento exponencial a 600 nanómetros (DO_{600}) con el tiempo a 40°C.

Tal como conoce el experto, puede variar de especie a especie cuando el cultivo está en crecimiento exponencial. El experto sabrá cómo determinar el crecimiento en fase exponencial, por ejemplo, entre DO_{600} 0,1-1,0.

La densidad óptica (DO) del cultivo se mide en un espectrofotómetro.

Conclusión:

Basándose en el patrón de crecimiento de mutantes con resistencia a 2-desoxiglucosa de este ejemplo 2, para una cepa específica de interés (por ejemplo, una de un producto comercial relevante), el experto puede someter a prueba rutinariamente si esta cepa específica de interés tiene el patrón de crecimiento relevante en el presente documento que es una propiedad de los mutantes seleccionados.

EJEMPLO 3: Ensayo de análisis de mutaciones del gen que codifica para glucosa cinasa.

Se aisló el ADN total de los mutantes identificados en el ejemplo 1 para realizar un ensayo de análisis de mutaciones del gen que codifica para glucosa cinasa. La secuenciación del gen de glucosa cinasa reveló que el gen en CHCC15757 contiene una mutación no conservada en el codón 141 que genera un codón de isoleucina en lugar de uno de treonina. La secuenciación del gen a partir de la CHCC15887 mutante reveló una mutación en el codón 72 que da como resultado un cambio de aminoácido no conservado de serina a prolina (figura 2)

Las cepas resistentes a 2-desoxiglucosa que cumplen las condiciones especificadas en los ejemplos 1 y 2 y aisladas tal como se describe en el ejemplo 1 se caracterizan por tener una mutación en el gen que codifica para glucosa cinasa (*glcK*). La mutación puede dar como resultado un cambio de aminoácido de la enzima codificada o dar como resultado la generación de un codón de terminación que truncará la enzima codificada.

Para revelar la mutación en el gen *glcK*, la cepa específica de interés se hace crecer en el caldo líquido (M17) al que se le añade lactosa al 2% a 40°C durante la noche. Tras el aislamiento del ADN cromosómico, se sometió el ADN a análisis de PCR usando con cebadores complementarios a una región conservada justo en el sentido de 5' y junto en el sentido de 3' del gen que codifica para glucosa cinasa. Las secuencias de los cebadores son:

GK1F: 5' CTT GGG TAA AAG GCT CTA TG 3' (SEQ ID NO. 3)

GK1R: 5' CGT TTT TCA ACA AAA AAG TGC TACC 3' (SEQ ID NO. 4)

Las condiciones para las reacciones PCR fueron tal como especifica el fabricante del kit de amplificación por PCR (ROCHE), por ejemplo

2 µl de ADN cromosómico

1 µl de cebador GK1F

1 µl de cebador GK1R

25 µl de mezcla maestra

21 µl de H₂O

Programa de PCR: (94°C-1,5 min, 50°C-1 min, 72°C-1,5 min)x30

La amplificación por PCR genera un fragmento de 1168 pb. Tras la purificación usando un kit de purificación de PCR de Biorad, se envió el fragmento de PCR para la secuenciación del ADN a MacroGen usando los mismos dos cebadores que se usaron para la amplificación. Tras la secuenciación, la secuencia de ADN se comparó con la de la cepa madre.

EJEMPLO 4. Análisis de hidratos de carbono de leche fermentada.

En otro experimento, se determinaron las concentraciones de azúcar de azúcar relevante en leche fermentada con CHCC14994, CHCC11976, CHCC15757 y CHCC15887, respectivamente. Se inoculó leche B al 9,5% con el 1% (10⁶-

10⁷ UFC/ml) de un cultivo hecho crecer durante la noche en caldo M17 al que se le añade galactosa al 2%. Se siguió la acidificación con un registrador de datos INTAB PC y software Easyview. Tras 30 horas de acidificación a 40°C, se tomaron muestras de leche para análisis de HPLC para obtener el contenido de ácidos y azúcares relevantes. Las curvas de acidificación mostraron que los mutantes tenían un inicio ligeramente retrasado de la acidificación pero terminaban a un pH final similar. Los datos de HPLC se presentan en la tabla 1.

A partir de la tabla 1, es evidente que las dos cepas mutantes para *glcK*, CHCC15757 y CHCC15887, consumen al menos el 71% de la lactosa, mientras que las cepas madre consumen aproximadamente el 28% de la lactosa. Para el mutante más fermentador de lactosa, CHCC15887, quedan tan solo 11,9 mg/ml en la leche fermentada, lo que indica un papel de este producto incluso para personas con intolerancia a la lactosa. Muy significativamente, los dos mutantes de *glcK* han excretado entre 8,3 y 11,3 mg/ml de glucosa mientras que la secreción de glucosa de las cepas madre está por debajo del nivel de detección. Al mismo tiempo, ambas cepas mutantes también secretan más galactosa que las cepas madre: entre el 34 y el 52%. Teniendo en cuenta que la sacarosa es una referencia de 100, y el dulzor de la lactosa es de 16, el dulzor de la galactosa es de 32 y el dulzor de la glucosa es de 74,3, un cálculo del dulzor relativo del producto fermentado final sugiere un dulzor 2,0 veces más dulce cuando se fermenta con el mejor mutante CHCC15757 que con la cepa madre correspondiente CHCC14994.

Tabla 1: Datos de HPLC de muestras de leche.

Muestra N.º	Cantidad mg/ml	Cantidad mg/ml	Cantidad mg/ml	Cantidad mg/ml	Cantidad mg/ml	Cantidad mg/ml	Cantidad mg/ml	
	Ácido cítrico	Ácido láctico	Ácido acético	Galactosa	Glucosa	Lactosa	Fructosa	Dulzor
Límite de detección	<1,25	<1,25	<1,25	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	
Leche	1,8	1,7	<1,25	<1,5	<1,5	47,6	<1,5	761,6
CHCC11976	2,0	8,2	<1,25	7,2	<1,5	34,4	<1,5	781
CHCC15887	1,8	7,8	<1,25	10,9	8,3	11,9	<1,5	1156
CHCC14994	1,8	7,2	<1,25	4,9	<1,5	34,3	<1,5	705,6
CHCC15757	1,7	7,1	<1,25	10,3	11,3	13,8	<1,5	1390
Dulzor calculado: mg/ml de glucosa *74 + mg/ml de lactosa *16 + mg/ml de galactosa * 32.								

Como las dos cepas mutantes para *glcK*, CHCC15757 y CHCC15887, excretan altos niveles de glucosa, se contempla que las mutaciones en el gen *glcK* inactivan la proteína glucocinasa codificada.

EJEMPLO 5: Selección de cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* resistentes a 2-desoxiglucosa

Selección de mutantes resistentes a 2-desoxiglucosa

Dos cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* de interés, CHCC759 y CHCC10019, se inocularon independientemente entre sí en 10 ml del caldo MRS-IM descrito anteriormente que contenía lactosa al 2% y se incubaron de manera anaerobia a 40°C durante la noche. En la siguiente etapa, se sembraron en placa muestras de estos cultivos que contenían aproximadamente 3 X 10⁸ células en placas de agar MRS-IM que contenían lactosa al 2% y además que contenían 2-desoxiglucosa 20 mM. Se purificaron las colonias que surgieron en las placas mediante siembra en estrías de colonias individuales sobre placas de agar MRS-IM que contenían lactosa al 2% y además que contenían 2-desoxiglucosa 20 mM y se caracterizaron adicionalmente tal como se describe a continuación.

Ensayo de resistencia a 2-desoxiglucosa:

El siguiente método es adecuado para determinar si una cepa de interés es resistente o no a 2-desoxiglucosa. Se inoculan cepas de interés en 10 ml del caldo MRS-IM descrito anteriormente que contiene lactosa al 2% y se incubaron de manera anaerobia a 40°C durante la noche. En la siguiente etapa, se siembran en placa muestras diluidas de estos cultivos que contienen aproximadamente 10⁴-10⁵ células sobre placas de agar MRS-IM que contienen lactosa al 2% y además que contienen la misma concentración de 2-desoxiglucosa que se usó para la selección del mutante resistente (normalmente 20 mM pero podrían usarse otras concentraciones). Las placas de agar se incuban en condiciones anaerobias durante 20 horas a 40°C y se inspeccionan. Las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que no son resistentes a 2-desoxiglucosa producirán pocas colonias, si es que producen alguna, mientras que las cepas que son resistentes a 2-desoxiglucosa producirán una multitud de colonias. Los controles apropiados incluyen las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, CHCC759 y CHCC10019, que son sensibles a 2-desoxiglucosa a una concentración de 20 mM y CHCC16159 y CHCC16160 que son resistentes a 2-desoxiglucosa 20 mM.

Resultado: Mediante este enfoque, se aislaron varios clones que fueron capaces de crecer en las condiciones selectivas en presencia de 2-desoxiglucosa. Las cepas mutantes que mostraron un crecimiento rápido sobre placas

con 2-desoxiglucosa se designaron CHCC16159 (derivada de la cepa madre CHCC759) y CHCC16160 (derivada de la cepa madre CHCC10019). Estas cepas mutantes se depositaron en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ).

5 EJEMPLO 6: *Patrón de crecimiento de mutantes resistentes a 2-desoxiglucosa de Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

10 Para garantizar que los mutantes resistentes a 2-desoxiglucosa de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* o bien han perdido la capacidad de crecer sobre glucosa o bien tienen una capacidad alterada para crecer sobre glucosa como fuente de carbono, se comparó el patrón de crecimiento de los mutantes con el de las cepas madre haciendo crecer ambas cepas madre, CHCC759 y CHCC10019, y los mutantes, CHCC16159 y CHCC16160, en caldo MRS-IM que contenía glucosa al 2%.

15 Mientras que las 2 cepas madre, CHCC759 y CHCC10019, crecieron exponencialmente en caldo MRS-IM al que se añadió glucosa al 2% con un tiempo de duplicación menor de 10 horas, los dos mutantes resistentes a 2-desoxiglucosa CHCC16159 y CHCC16160 no crecieron o crecieron solo muy lentamente en este medio. El crecimiento en la fase exponencial se monitorizó midiendo la densidad óptica del cultivo en crecimiento exponencial a 600 nanómetros (DO₆₀₀) a 40°C en un espectrofotómetro. La fase exponencial de crecimiento se alcanzó entre DO₆₀₀ 0,1-1,0.

20 EJEMPLO 7: *Análisis de hidratos de carbono de leche fermentada con cepas de Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus.*

25 En otro experimento, se determinaron las concentraciones de azúcar de diferentes azúcares en leche fermentada con las cepas de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CHCC759, CHCC10019, CHCC16159 y CHCC16160, respectivamente. Se inoculó leche B al 9,5% con el 1% (10⁶-10⁷ UFC/ml) de un cultivo líquido hecho crecer durante la noche de manera anaerobia en caldo MRS-IM que contenía lactosa al 2%. Se siguió la acidificación con un registrador de datos INTAB PC y el software Easyview. Tras 30 horas de acidificación a 40°C, se tomaron muestras de leche para análisis de HPLC para medir las cantidades de diversos azúcares y ácidos orgánicos. Las curvas de acidificación mostraron que los mutantes tenían un inicio de la acidificación algo retrasado y terminaban a un pH final ligeramente superior. Los datos de HPLC se presentan en la tabla 2.

35 Tal como puede observarse a partir de la tabla 2, las dos cepas mutantes resistentes a 2-desoxiglucosa, CHCC16159 y CHCC16160, consumieron al menos aproximadamente el 94% de la lactosa, mientras que las cepas madre consumieron al menos aproximadamente el 37% de la lactosa. Para el mutante que muestra la mayor producción de ácido láctico, CHCC16160, quedaban tan solo 2,9 mg/ml de lactosa en la leche fermentada. Productos lácteos fermentados con tales niveles bajos de lactosa podrían ser adecuados para su consumo por personas con intolerancia a la lactosa.

40 Significativamente, las dos cepas mutantes, CHCC16159 y CHCC16160, excretaron entre 15,2 y 15,8 mg/ml de glucosa mientras que la secreción de glucosa de las cepas madre está por debajo del nivel de detección para CHCC10019 y 4,2 mg/ml para CHCC759, respectivamente. Al mismo tiempo, ambas cepas mutantes también secretaron más galactosa que las cepas madre. Si el valor de referencia para el dulzor de la sacarosa es 100, y el dulzor de la lactosa es de 16, el dulzor de la galactosa es de 32 y el dulzor de la glucosa es de 74, un cálculo del dulzor relativo del producto fermentado final sugiere que la CHCC16160 mutante produce un producto lácteo fermentado que es 2,5 veces más dulce que con la cepa madre correspondiente CHCC10019.

Tabla 2: Datos de HPLC de muestras de leche.

Muestra	Cantidad	Cantidad	Cantidad	Cantidad	Cantidad	Cantidad	Cantidad	
N.º	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	
	Ácido cítrico	Ácido láctico	Ácido acético	Galactosa	Glucosa	Lactosa	Fructosa	Dulzor
Límite de detección	<1,25	<1,25	<1,25	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	
Leche	1,9	<1,25	<1,25	<1,5	<1,5	55,5	<1,5	888
CHCC759	1,8	9,6	<1,25	13,1	4,2	18,1	<1,5	1021
CHCC16159	2,0	7,9	<1,25	21,4	15,2	1,7	<1,5	1841
CHCC10019	1,8	11,1	<1,25	12,4	>1,5	20,8	<1,5	730
CHCC16160	1,9	5,4	<1,25	19,4	15,8	2,9	<1,5	1841
Dulzor calculado: mg/ml de glucosa *74 + mg/ml de lactosa *16 + mg/ml de galactosa * 32.								

50 EJEMPLO 8: *Selección de un mutante hiperfermentador de lactosa y secretor de glucosa de Streptococcus thermophilus*

Con el fin de aislar un mutante hiperfermentador de lactosa y secretor de glucosa de la cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC15757, se inocularon células derivadas del crecimiento de una única colonia en 10 ml de caldo M17 que contenía galactosa al 2% y se hicieron crecer durante la noche a 40°C.

5 El día siguiente, se sembró en placa la cepa en diluciones en serie sobre placas de agar M17 que contenían galactosa al 2% y una concentración de 2-desoxiglucosa de 30 mM y se incubaron durante 20 horas a 40°C. En primer lugar, las colonias resistentes volvieron a sembrarse en estrías sobre el mismo tipo de placas de agar que en las que se seleccionaron. Se usaron los supervivientes para inocular caldo M17 nuevo que contenía o bien lactosa al 2%, galactosa al 2%, sacarosa al 2% o bien glucosa al 2%.

10 A partir de esto, se fue capaz de aislar un mutante, CHCC16404, derivado de CHCC15757, que era incapaz de crecer en leche B pero que era capaz de crecer en M17 al que se le añadió sacarosa al 2% a 40°C. Además, CHCC16404 era incapaz de crecer en M17 al que se le añadió glucosa al 2%.

15 El crecimiento en la fase exponencial se mide en el presente documento como el desarrollo de densidad óptica del cultivo en crecimiento exponencial a 600 nanómetros (DO_{600}) con el tiempo a 40°C.

EJEMPLO 9: *Patrón de crecimiento del mutante de Streptococcus thermophilus hiperfermentador de lactosa y secretor de glucosa CHCC16404*

20 Para garantizar el mantenimiento y el crecimiento apropiado de CHCC16404 mutante, se hizo crecer la cepa a 40°C en M17 al que se le añadió sacarosa al 2%. Para la sorpresa de los inventores, se observó que la cepa mutante CHCC16404 era capaz de acidificar leche B al 9,5% solo cuando se inoculó la cepa con el 1% (10^6 - 10^7 UFC/ml) de un cultivo hecho crecer durante la noche en caldo M17 al que se le añadió sacarosa al 2% o cuando se añadió sacarosa a la leche. Se observó que la adición de tan solo el 0,01% de sacarosa a la leche permitía que CHCC16404 acidificara leche B al 9,5%. Además, CHCC16404 era incapaz de crecer en M17 al que se le añadió glucosa al 2% a 40°C en contraposición a la cepa madre CHCC15757 que puede crecer en M17 al que se le añade glucosa en las mismas condiciones. Conjuntamente, estos resultados indicaron que el tratamiento con 2-desoxiglucosa de CHCC15757, que generaba CHCC16404, ha seleccionado una mutación que inactiva el sistema de captación de glucosa inhabilitando la captación de glucosa secretada a partir del medio.

EJEMPLO 10: *Análisis de hidratos de carbono de leche fermentada con el mutante de Streptococcus thermophilus hiperfermentador de lactosa y secretor de glucosa CHCC16404*

35 En otro experimento, se determinaron las concentraciones de azúcar de azúcares relevantes en leche fermentada con CHCC16404. Se inocularon botellas que contenían leche B al 9,5% a la que se añade el 0,01%, el 0,02%, el 0,03% y el 0,05% de sacarosa respectivamente con el 1% (10^6 - 10^7 UFC/ml) de un cultivo hecho crecer durante la noche en caldo M17 al que se le añade 2% sacarosa. Se siguió la acidificación con un registrador de datos INTAB PC y software Easyview. Tras 30 horas de acidificación a 40°C, se tomaron muestras de leche para análisis de HPLC para obtener el contenido de ácidos y azúcares relevantes.

40 A partir de la tabla 3, resulta evidente que el mutante hiperfermentador de lactosa y secretor de glucosa CHCC16404, sorprendentemente, consume toda la lactosa a todas las concentraciones de sacarosa añadida sometidas a prueba en este experimento. También se observó que cuando se añadió una mayor concentración de sacarosa (por ejemplo > 0,1 mg/ml), la fermentación de lactosa no se completa antes de que se alcance el pH final. Además, la tabla 3 también muestra que toda la lactosa se convierte en glucosa y galactosa y que solo parte de la galactosa se usa para la fermentación a todas las concentraciones de sacarosa añadida. De manera interesante, la glucosa secretada no se capta de nuevo, dejando de ese modo más de 23,9 mg/ml de glucosa en la leche. Puesto que aproximadamente el 25% de la galactosa se fermenta, quedan más de 16 mg/ml de galactosa en la leche tras la fermentación. Estos datos indican que CHCC16404, además de la mutación de *gicK* heredada de la cepa madre CHCC15757, también alberga una mutación que inactiva el sistema de captación de glucosa inhabilitando la captación de glucosa secretada a partir del medio. La comparación de los datos de la tabla 3 con los que la tabla 1 y teniendo en cuenta que la sacarosa es una referencia de 100, y el dulzor de la lactosa es de 16, el dulzor de la galactosa es de 32 y el dulzor de la glucosa es de 74,3, un cálculo del dulzor relativo del producto fermentado final genera un dulzor aproximadamente 3,5 veces más dulce cuando se fermenta con CHCC16404 que con la cepa CHCC14994.

Tabla 3: Datos de HPLC de muestras de leche.

Muestra	Cantidad	Cantidad	Cantidad	Cantidad	Cantidad	Cantidad	
N.º	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	
	Ácido cítrico	Ácido láctico	Ácido acético	Galactosa	Glucosa	Lactosa	Dulzor
Límite de detección	<1,25	<1,25	<1,25	<1,5	<1,5	<1,5	
Leche	1,8	1,7	<1,25	<1,5	<1,5	47,6	762

CHCC16404+ el 0,01% de sacarosa	1,9	5,4	<1,25	16,1	23,9	<1,5	2291
CHCC16404+ el 0,02% de sacarosa	2,0	5,6	<1,25	17,0	25,3	<1,5	2424
CHCC16404+ el 0,03% de sacarosa	2,0	5,6	<1,25	16,4	24,1	<1,5	2315
CHCC16404+ el 0,05% de sacarosa	2,1	6,0	<1,25	17,3	25,4	<1,5	2441
Dulzor calculado: mg/ml de glucosa *74 + mg/ml de lactosa *16 + mg/ml de galactosa * 32.							

EJEMPLO 11: *Análisis de hidratos de carbono de leche fermentada con una combinación de cepas de Streptococcus thermophilus y cepas de Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus.*

5 En este experimento, se determinaron las concentraciones de azúcares y ácidos orgánicos en leche fermentada con combinaciones de una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (seleccionada de CHCC759, CHCC10019, CHCC16159 y CHCC16160) y una cepa de *Streptococcus thermophilus* que era o bien CHCC14994, CHCC15757 o bien CHCC16404.

10 La producción de yogur implica normalmente el uso de un cultivo iniciador mixto que contiene cepas tanto de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* como de *Streptococcus thermophilus*. Normalmente, el sustrato lácteo usado en la producción de yogur se inocula con 1 parte de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y 9 partes de *Streptococcus thermophilus*. Con el fin de analizar las capacidades de secreción de glucosa en una configuración convencional para la producción de yogur, se inoculó leche B al 9,5% con el 0,1% de un cultivo de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* hecho crecer durante la noche de manera anaerobia en caldo MRS-IM que contenía lactosa al 2% y el 0,9% de un cultivo de *Streptococcus thermophilus* hecho crecer durante la noche en caldo M17 que contenía galactosa al 2% (CHCC15757) o sacarosa al 2% (CHCC16404). Se siguió la acidificación con un registrador de datos INTAB PC y software Easyview. Tras 30 horas de acidificación, se tomaron muestras de leche para análisis de HPLC para medir la cantidad de diferentes azúcares y ácidos. Los datos de HPLC se presentan en la tabla 4.

20 A partir de la tabla 4 puede observarse que el uso de la cepa mutante resistente a 2-desoxiglucosa CHCC15757 y CHCC16404 de *Streptococcus thermophilus* da como resultado secreción de glucosa a la leche independientemente de si se combina con una cepa madre de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* o con un mutante resistente a 2-desoxiglucosa de la misma. Sin embargo, las concentraciones de glucosa son superiores cuando se usa una combinación de cepas mutantes resistentes a 2-desoxiglucosa de ambas especies, por ejemplo, una combinación de CHCC15757 y CHCC16159, o una combinación de CHCC15757 y CHCC16160. Cuando se usan estos cultivos mixtos, se encontró que se consumía al menos el 82% de la lactosa, y se encontró que se excretaban entre 11,8 mg/ml y 14,1 mg/ml de glucosa. Se obtienen resultados similares cuando la cepa de *Streptococcus thermophilus* es CHCC15887 que es también un mutante resistente a 2-desoxiglucosa con una mutación en el gen *glcK*.

30 Al mismo tiempo, la presencia de una cepa mutante resistente a 2-desoxiglucosa en el cultivo iniciador también dio como resultado la excreción de más galactosa. Cuando se usa una combinación de cepas mutantes, por ejemplo, CHCC15757 y CHCC16159, la excreción de galactosa es aproximadamente 3 veces superior (17,1 mg/ml) en comparación con un cultivo iniciador que comprende las cepas madres correspondientes CHCC14994 y CHCC10019.

35 La secreción de Glucosa es incluso más eficaz cuando se usa una combinación del mutante hiperfermentador de lactosa y secretor de glucosa *Streptococcus thermophilus* CHCC16404 y las cepas mutantes resistentes a 2-desoxiglucosa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, por ejemplo, una combinación de CHCC16404 y CHCC16159, o una combinación de CHCC16404 y CHCC16160.

40 Teniendo en cuenta que el dulzor de la sacarosa es de 100 (valor de referencia), y el dulzor de la lactosa es de 16, el dulzor de la galactosa es de 32 y el dulzor de la glucosa es de 74, un cálculo del dulzor relativo del producto fermentado final, presentado en la última fila de la tabla 4, sugiere que la diferente combinación de cepas permite la definición de la concentración final de lactosa residual, glucosa y galactosa en el producto fermentado final. Si se desea un yogur con dulzor interno máximo debido a altas concentraciones de glucosa y galactosa secretadas y sin lactosa residual, entonces la combinación más eficaz de cepas es CHCC16404 y CHCC16160. Esta combinación proporcionó un yogur que es 3,6 veces más dulce que la combinación correspondiente de cepas sensibles a 2-DG de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, CHCC14994 y CHCC10019 y no queda lactosa detectable en la leche fermentada.

50

Tabla 4: Datos de HPLC de muestras de leche fermentada con cultivos mixtos

ES 2 765 177 T5

Cepas	Cantidad mg/ml	Cantidad mg/ml	Cantidad mg/ml	Cantidad mg/ml	Cantidad mg/ml	Cantidad mg/ml	
	Ácido cítrico	Ácido láctico	Ácido acético	Galactosa	Glucosa	Lactosa	Dulzor
Límite de detección	<1,25	<1,25	<1,25	<1,5	<1,5	<1,5	
Leche	1,7	<1,25	<1,25	<1,5	<1,5	51,6	
CHCC14994+CHCC10019	1,8	7,6	<1,25	5,7	<1,5	33,6	722
CHCC14994+CHCC16159	1,9	7,7	<1,25	5,6	<1,5	36,4	762
CHCC15757+CHCC10019	1,7	9,7	<1,25	12,9	6,5	13,2	1108
CHCC15757+CHCC16159	2,0	10,4	<1,25	17,1	14,1	9,5	1743
CHCC14994 + CHCC759	1,7	7,4	<1,25	5,6	<1,5	31,6	686
CHCC14994 + CHCC16160	1,8	7,3	<1,25	5,5	<1,5	32,4	693
CHCC15757+CHCC759	2,1	13,8	<1,25	16,6	6,5	12,2	1209
CHCC15757+CHCC16160	2,0	8,7	<1,25	13,2	11,8	8,5	1432
CHCC16404+CHCC10019	2,2	8,1	<1,25	11,5	1,8	24,9	900,1
CHCC16404+CHCC16159	2,2	7,8	1,3	20,9	14,9	3,9	1838,3
CHCC16404+CHCC16160	2,3	7,7	<1,25	23,1	22,3	<1,5	2396,1
CHCC16404*+CHCC10019	2,1	10,7	<1,25	17,7	11,9	3,2	1501,8
CHCC16404*+CHCC16159	2,0	11,0	<1,25	22,2	20,2	<1,5	2211,3
CHCC16404*+CHCC16160	2,1	6,6	<1,25	18,3	25,8	<1,5	2502,5
* adición del 0,05% de sacarosa Dulzor calculado: mg/ml de glucosa *74 + mg/ml de lactosa *16 + mg/ml de galactosa * 32.							

EJEMPLO 12. *Mejora del crecimiento de bifidobacterias mediante el uso de mutantes secretores de glucosa de Streptococcus thermophilus y Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus.*

- 5 Algunas de las bacterias probióticas más reconocidas como *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12® (comercialmente disponible de Chr. Hansen A/S, Hoersholm, Dinamarca) no crecen bien cuando están presentes solas en medio basado en lactosa como leche. En este experimento, se ha investigado por tanto el efecto de combinar *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12® con una cepa secretora de glucosa de *Streptococcus thermophilus* o *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

10 Experimento 1:

Se hizo crecer CHCC 5445 (BB-12®) en condiciones anaerobias durante la noche a 40°C en MRS+el 0,05% de cloruro de cisteína.

15 Se hizo crecer CHCC14994 durante la noche a 40°C en M17 con galactosa al 2%.

Se hizo crecer CHCC 15757 durante la noche a 40°C en M17 con galactosa al 2%.

20 Experimento 2:

Se hizo crecer CHCC 5445 (BB-12®) en condiciones anaerobias durante la noche a 40°C en MRS+el 0,05% de cloruro de cisteína.

25 Se hizo crecer CHCC10019 durante la noche en condiciones anaerobias a 40°C en MRS con lactosa al 2%.

Se hizo crecer CHCC16159 durante la noche en condiciones anaerobias a 40°C en MRS con lactosa al 2%.

30 Se inoculan seis botellas con 200 ml de leche B a 40°C durante la noche con un total del 1% de los cultivos sobrecrecidos que tenían densidades ópticas similares:

1. El 1% de CHCC 5445 (BB-12®).
2. El 0,5% de CHCC 5445 (BB-12®) + el 0,5% de CHCC14994
3. El 0,5% de CHCC 5445 (BB-12®) + el 0,5% de CHCC15757
4. El 1% de CHCC5445 (BB-12®).
- 40 5. El 0,5% de CHCC 5445 (BB-12®) + el 0,5% de CHCC10019

6. El 0,5% de CHCC 5445 (BB-12®) + el 0,5% de CHCC16159

Solo las botellas 2-3 y 5-6 se acidificaron debido al escaso rendimiento de BB-12 en la leche. Tras la fermentación, se sembraron en placa 100 µl de cada cultivo en diferentes diluciones (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}) sobre placas de agar que seleccionan el crecimiento de BB-12® específicamente, es decir MRS + el 0,05% de cloruro de cisteína + tetraciclina añadida 10 µg/ml de tetraciclina y luego se incubaron en condiciones anaerobias durante la noche a 40°C. Posteriormente se determinó el número de colonias mediante recuento y en la tabla 5 se proporciona un promedio de los resultados como UFC/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro).

Tabla 5. UFC/ml de BB-12 en cultivos de leche fermentada

Experimento	Cultivos	UFC/ml
1	El 1% de CHCC 5445 (BB-12)	4,50E+07
1	El 0,5% de CHCC 5445 (BB-12) + el 0,5% de CHCC14994	4,00E+07
1	El 0,5% de CHCC 5445 (BB-12) + el 0,5% de CHCC15757	4,00E+08
2	El 1% de CHCC 5445 (BB-12)	6,00E+07
2	El 0,5% de CHCC 5445 (BB-12) + el 0,5% de CHCC10019	2,00E+07
2	El 0,5% de CHCC 5445 (BB-12) + el 0,5% de CHCC16159	1,40E+08

Solo cuando los mutantes secretores de glucosa de *Streptococcus thermophilus*, CHCC15757 y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, CHCC16159 están presentes junto con BB-12®, el crecimiento de BB-12® se refuerza y el recuento celular total presentado como UFC/ml es aproximadamente $10 \times$ (1 log) superior en estos cultivos. Este resultado sugiere que pueden usarse cepas secretoras de glucosa para reforzar el contenido de cepas probióticas como BB-12® cuando se mezclan juntas en cultivos.

EJEMPLO 13. Comparación genómica de CHCC15757 y CHCC16404 e identificación de una mutación en el gen *manM* que codifica para la proteína IIC^{Man} del sistema de glucosa/manosa fosfotransferasa (PTS).

Se secuenciaron preparaciones de ADN genómico de CHCC15757 y CHCC16404 en Beijing Genomics Institute (BGI, Beijing, China) y se ensamblaron y terminaron usando el software de mesa de laboratorio genómico CLC (CLCBio, Århus, Dinamarca). Se alinearon las secuencias genómicas de CHCC15757 y CHCC16404 usando la secuencia genómica anotada de CHRZ1066 como referencia usando el software Mauve 2.3.1. Tras la alineación, se realizó el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) usando el software Mauve 2.3.1 libre tanto en CHCC15757 como en CHCC16404. Esto permitió la identificación de una mutación de G a T en el codón GAA (ácido glutámico) en la posición de aminoácido 209 en el gen *manM* que codifica para la proteína IIC^{Man} de la glucosa/manosa PTS. Este cambio introdujo un codón de terminación TAA en la posición 209 de la proteína (figura 3) dando como resultado la producción de una proteína IIC^{Man} truncada y, por tanto, no funcional. Por tanto, se contempla que esta mutación dé como resultado la prevención del transporte de glucosa al interior de la célula por medio de la glucosa/manosa PTS.

Depósitos y disoluciones de expertos

El solicitante pide que una muestra de los microorganismos depositados establecidos a continuación solo pueda estar disponible para un experto, hasta la fecha en la que se conceda la patente.

La cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC15757 se ha depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania, el 3 de abril de 2012 con el n.º de registro DSM 25850

La cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC15887 se ha depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania, el 3 de abril de 2012 con el n.º de registro DSM 25851

La cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC16404 se ha depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania, el 12 de diciembre de 2012 con el n.º de registro DSM 26722.

La cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC14994 se ha depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania, el 3 de abril de 2012 con el n.º de registro DSM 25838.

La cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC11976 se ha depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania, el 8 de septiembre de 2009 con el n.º de registro DSM 22934.

5 La cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC759 se ha depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania, el 6 de septiembre de 2012 con el n.º de registro DSM 26419.

10 La cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC10019 se ha depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania, el 3 de abril de 2007 con el n.º de registro DSM 19252.

15 La cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159 se ha depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania, el 6 de septiembre de 2012 con el n.º de registro DSM 26420.

20 La cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160 se ha depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania, el 6 de septiembre de 2012 con el n.º de registro DSM 26421.

La cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CHCC5445 (BB-12®) se ha depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania, el 30 de septiembre de 2003 con el n.º de registro DSM 15954

25 Los depósitos se realizaron según el tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos con fines de procedimiento de patentes.

Bibliografía

30 Documento WO 2011/026863

Pool *et al* (2006) *Metabolic Engineering* 8(5); 456-464

Thompson *et al.* (1985) *J. Bacteriol.* 162(1); 217-223

35 Chervaux *et al.* (2000). *Appl and Environ Microbiol*, 66, 5306-5311

Cochu *et al.* (2003). *Appl and Environ Microbiol*, 69(9), 5423-5432

40 Høier *et al.* (2010) en *The Technology of Cheesemaking*, 2ª ed. Blackwell Publishing, Oxford; 166-192.

Lista de secuencias

<110> Chr. Hansen A/S

45 <120> Uso de bacterias del ácido láctico para preparar productos alimenticios fermentados con dulzor natural aumentado

<130> P4456PC00

50 <160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

55 <210> 1

<211> 969

<212> ADN

<213> *Streptococcus thermophilus*

60 <400> 1

ES 2 765 177 T5

atgagtaaga aactccttagg tattgacctt ggtggaacaa ctgttaagtt tggatatttg 60
actgcagatg gtgaagtcca agaaaaatgg gctattgaaa caaatcgtt tgaaaatggg 120
agccacattg ttcctgacat tgtagaatct ttgaaacacc gtttgggaatt gtatggactt 180
actgctgaag attttattgg aattggtatg ggatctccag gtgcagttga ccgagaaaat 240
aaaacagtaa cgggtgcctt taacttgaac tgggcagaaa ctcaagaagt tggctctggt 300
attgaaaaag aacttgggat tccattcgct attgataatg atgctaagt ggctgcactg 360
ggtgaacggt gggttggtgc tgggtgctaac aatcggaatg ttgtctttat aacattgggt 420
acaggtggtg gtggcgggtg tatcgctgat ggtaacttaa ttcattggtg tgccgggtgct 480
ggtggggaaa ttggtcacat tattggtgaa cctgacacag gatttgagtg tacttgcgga 540
aacaaggggt gtctggaac tgtagcttca gcaacaggta ttgtacgtg agcacatcat 600
ttggcagaaa aatacgaagg aaactcttct attaaagctg ctgtagacaa tggtgagttt 660
gtgacaagta aagatattat cgtagctgct actgaagggtg ataagtttgc tgacagcatt 720
gttgataaag tctctaaata cctcggactt gcaacagcaa acatctcaa cattcttaac 780
ccagattctg tcgttatcgg tgggtggtgt tctgccgcag gagaattctt gcgtagtcgt 840
gttgaaggat actttacacg ttatgcattc ccacaagttc gccgtacaac aaaagtgaaa 900
ttagcggagc ttggaaatga tgcaggaatc attggagctg ctagtcttgc ttatagtatt 960
gacaaataa 969

<210> 2

<211> 322

5 <212> PRT

<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 2

10 Met Ser Lys Lys Leu Leu Gly Ile Asp Leu Gly Gly Thr Thr Val Lys
1 5 10 15

ES 2 765 177 T5

Phe Gly Ile Leu Thr Ala Asp Gly Glu Val Gln Glu Lys Trp Ala Ile
 20 25 30
 Glu Thr Asn Thr Phe Glu Asn Gly Ser His Ile Val Pro Asp Ile Val
 35 40 45
 Glu Ser Leu Lys His Arg Leu Glu Leu Tyr Gly Leu Thr Ala Glu Asp
 50 55 60
 Phe Ile Gly Ile Gly Met Gly Ser Pro Gly Ala Val Asp Arg Glu Asn
 65 70 75 80
 Lys Thr Val Thr Gly Ala Phe Asn Leu Asn Trp Ala Glu Thr Gln Glu
 85 90 95
 Val Gly Ser Val Ile Glu Lys Glu Leu Gly Ile Pro Phe Ala Ile Asp
 100 105 110
 Asn Asp Ala Asn Val Ala Ala Leu Gly Glu Arg Trp Val Gly Ala Gly
 115 120 125
 Ala Asn Asn Arg Asn Val Val Phe Ile Thr Leu Gly Thr Gly Val Gly
 130 135 140
 Gly Gly Val Ile Ala Asp Gly Asn Leu Ile His Gly Val Ala Gly Ala
 145 150 155 160
 Gly Gly Glu Ile Gly His Ile Ile Val Glu Pro Asp Thr Gly Phe Glu
 165 170 175
 Cys Thr Cys Gly Asn Lys Gly Cys Leu Glu Thr Val Ala Ser Ala Thr
 180 185 190
 Gly Ile Val Arg Val Ala His His Leu Ala Glu Lys Tyr Glu Gly Asn
 195 200 205
 Ser Ser Ile Lys Ala Ala Val Asp Asn Gly Glu Phe Val Thr Ser Lys
 210 215 220
 Asp Ile Ile Val Ala Ala Thr Glu Gly Asp Lys Phe Ala Asp Ser Ile
 225 230 235 240
 Val Asp Lys Val Ser Lys Tyr Leu Gly Leu Ala Thr Ala Asn Ile Ser
 245 250 255
 Asn Ile Leu Asn Pro Asp Ser Val Val Ile Gly Gly Gly Val Ser Ala

ES 2 765 177 T5

260

265

270

Ala Gly Glu Phe Leu Arg Ser Arg Val Glu Gly Tyr Phe Thr Arg Tyr
 275 280 285

Ala Phe Pro Gln Val Arg Arg Thr Thr Lys Val Lys Leu Ala Glu Leu
 290 295 300

Gly Asn Asp Ala Gly Ile Ile Gly Ala Ala Ser Leu Ala Tyr Ser Ile
 305 310 315 320

Asp Lys

<210> 3

<211> 20

5 <212> ADN

<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 3

10 cttgggtaaa aggctctatg 20

<210> 4

<211> 25

15 <212> ADN

<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 4

20 cgttttcaa caaaaaagig ctacc 25

<210> 5

<211> 828

25 <212> ADN

<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 5

atgtcagata tgtcaattat ttctgcgatt ttggtcgtag ctggtgcctt ccttgctggt 60

cttgaaagta tccttgacca attccaattc caccaaccac ttgttgcatt taccctcatc 120

ggtgctgcca caggtaacct cactgcaggt atcatgcttg gtggttctct tcaaatgatt 180

acccttgctt gggcaaacat cgggtgctgcc gtagctcctg acggtgccct tgcattctgtt 240

gccgctgcca tcattttggt taaaggtggt aaatttacag ctgaaggtat cgggtgttgcg 300

attgcaatag ctatcctgct tgcagttgca ggtctcttcc taactatgcc tgttcgtaca 360

gcatctattg cctttgttca tgctgcagat aaagctgcag aacacggaaa catcgctggt 420

gttgaacgtg catactacct cgctctcctt cttcaaggtt tgcgtattgc tgtgccagca 480

gcccttcttc ttgccatccc ggcccaatct gttcaacatg cccttggtt gatgcctgac 540

tggctcacc atggtttggt tgtcgggtggt ggtatggtcg tagccgttgg ttacgccatg 600

ES 2 765 177 T5

attatcaata tgatggctac tcgtgaagtt tggccattct tcgccattgg ttttgctttg 660
 gcagcaatta gcccaattgac acttatcgct cttagtacca ttggtgttgc catcgccttc 720
 atctacctca acctttctaa acaaggtggc ggaaatggtg gcggaaatgg tggcgggaact 780
 tcatctggtt caggcgaccc aatcggcgat atcttgggaag actactag 828

<210> 6

<211> 275

5 <212> PRT

<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 6

Met Ser Asp Met Ser Ile Ile Ser Ala Ile Leu Val Val Ala Val Ala
 1 5 10 15

Phe Leu Ala Gly Leu Glu Ser Ile Leu Asp Gln Phe Gln Phe His Gln
 20 25 30

Pro Leu Val Ala Cys Thr Leu Ile Gly Ala Ala Thr Gly Asn Leu Thr
 35 40 45

Ala Gly Ile Met Leu Gly Gly Ser Leu Gln Met Ile Thr Leu Ala Trp
 50 55 60

Ala Asn Ile Gly Ala Ala Val Ala Pro Asp Val Ala Leu Ala Ser Val
 65 70 75 80

Ala Ala Ala Ile Ile Leu Val Lys Gly Gly Lys Phe Thr Ala Glu Gly
 85 90 95

Ile Gly Val Ala Ile Ala Ile Ala Ile Leu Leu Ala Val Ala Gly Leu
 100 105 110

Phe Leu Thr Met Pro Val Arg Thr Ala Ser Ile Ala Phe Val His Ala
 115 120 125

Ala Asp Lys Ala Ala Glu His Gly Asn Ile Ala Gly Val Glu Arg Ala
 130 135 140

Tyr Tyr Leu Ala Leu Leu Leu Gln Gly Leu Arg Ile Ala Val Pro Ala
 145 150 155 160

Ala Leu Leu Leu Ala Ile Pro Ala Gln Ser Val Gln His Ala Leu Gly
 165 170 175

Leu Met Pro Asp Trp Leu Thr His Gly Leu Val Val Gly Gly Gly Met
 180 185 190

ES 2 765 177 T5

Val Val Ala Val Gly Tyr Ala Met Ile Ile Asn Met Met Ala Thr Arg
195 200 205

Glu Val Trp Pro Phe Phe Ala Ile Gly Phe Ala Leu Ala Ala Ile Ser
210 215 220

Gln Leu Thr Leu Ile Ala Leu Ser Thr Ile Gly Val Ala Ile Ala Phe
225 230 235 240

Ile Tyr Leu Asn Leu Ser Lys Gln Gly Gly Gly Asn Gly Gly Gly Asn
245 250 255

Gly Gly Gly Thr Ser Ser Gly Ser Gly Asp Pro Ile Gly Asp Ile Leu
260 265 270

Glu Asp Tyr
275

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Streptococcus thermophilus* fermentadora de galactosa, en la que la cepa porta una mutación en la secuencia de ADN del gen *glcK* que codifica para una proteína glucocinasa, en la que la mutación inactiva parcial o totalmente la proteína glucocinasa, provocando de ese modo que la cepa sea resistente a 2-desoxiglucosa de modo que es capaz de crecer hasta dar una colonia cuando se siembra en estrías sobre una placa de medio M17 que contiene galactosa al 2% (p/v), y 2-desoxiglucosa 20 mM tras incubación a 40°C durante 20 horas.
2. Una cepa de *Streptococcus thermophilus*, en la que la cepa se selecciona del grupo que consiste en la cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC15757 que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número de registro DSM 25850, la cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC15887 que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número de registro DSM 25851, la cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC16404 que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número de registro DSM 26722.
3. Una composición que comprende desde 10^4 hasta 10^{12} UFC/g de una cepa de *Streptococcus thermophilus* según la reivindicación 1 o 2.
4. Una composición según la reivindicación 3, en la que la composición comprende además desde 10^4 hasta 10^{12} UFC/g de al menos una cepa mutante de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, en la que dicha cepa es resistente a 2-desoxiglucosa de modo que es capaz de crecer hasta dar una colonia cuando se siembra en estrías sobre una placa de medio MRS-IM que contiene lactosa al 2% (p/v) y 2-desoxiglucosa 20 mM tras incubación a 40°C durante 20 horas.
5. Un método para producir un producto lácteo fermentado que comprende inocular y fermentar un sustrato lácteo con al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* según la reivindicación 1 o 2.
6. Un método para producir un producto lácteo fermentado que comprende inocular y fermentar un sustrato lácteo con la composición según la reivindicación 3 o 4.
7. Un producto lácteo fermentado que comprende al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* según la reivindicación 1 o 2.
8. Un producto lácteo fermentado que comprende la composición según la reivindicación 3 o 4.
9. Uso de una composición según la reivindicación 3 o 4 para la preparación de un producto lácteo fermentado.
10. Uso de una composición según la reivindicación 3 o 4 para aumentar el dulzor de un producto lácteo fermentado.
11. Uso de una composición según la reivindicación 3 o 4 para disminuir el contenido en lactosa en un producto lácteo fermentado.
12. Un producto lácteo fermentado según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 para su uso en evitar síntomas de intolerancia a la lactosa.
13. Uso de una cepa de *Streptococcus thermophilus* según la reivindicación 1 o 2 para mejorar el crecimiento de una cepa de *Bifidobacterium*.
14. Un método para cribar y aislar una cepa de *Streptococcus thermophilus* con un gen *glcK* mutado, en el que el método comprende las siguientes etapas:
 - a) proporcionar una cepa madre de *Streptococcus thermophilus* fermentadora de galactosa;
 - b) seleccionar y aislar de un conjunto de cepas de *Streptococcus thermophilus* mutantes derivadas de la cepa madre un conjunto de cepas de *Streptococcus thermophilus* mutantes que son resistentes a 2-desoxiglucosa de modo que sean capaces de crecer hasta dar una colonia cuando se siembran en estrías sobre una placa de medio M17 que contiene galactosa al 2% (p/v), y 2-desoxiglucosa 20 mM tras incubación a 40°C durante 20 horas;
 - c) seleccionar y aislar del conjunto de cepas de *Streptococcus thermophilus* mutantes que son resistentes a 2-desoxiglucosa una cepa de *Streptococcus thermophilus* mutante si la tasa de crecimiento de la cepa de *Streptococcus thermophilus* mutante es mayor en medio M17 + galactosa al 2% que en medio M17 + glucosa al 2%.

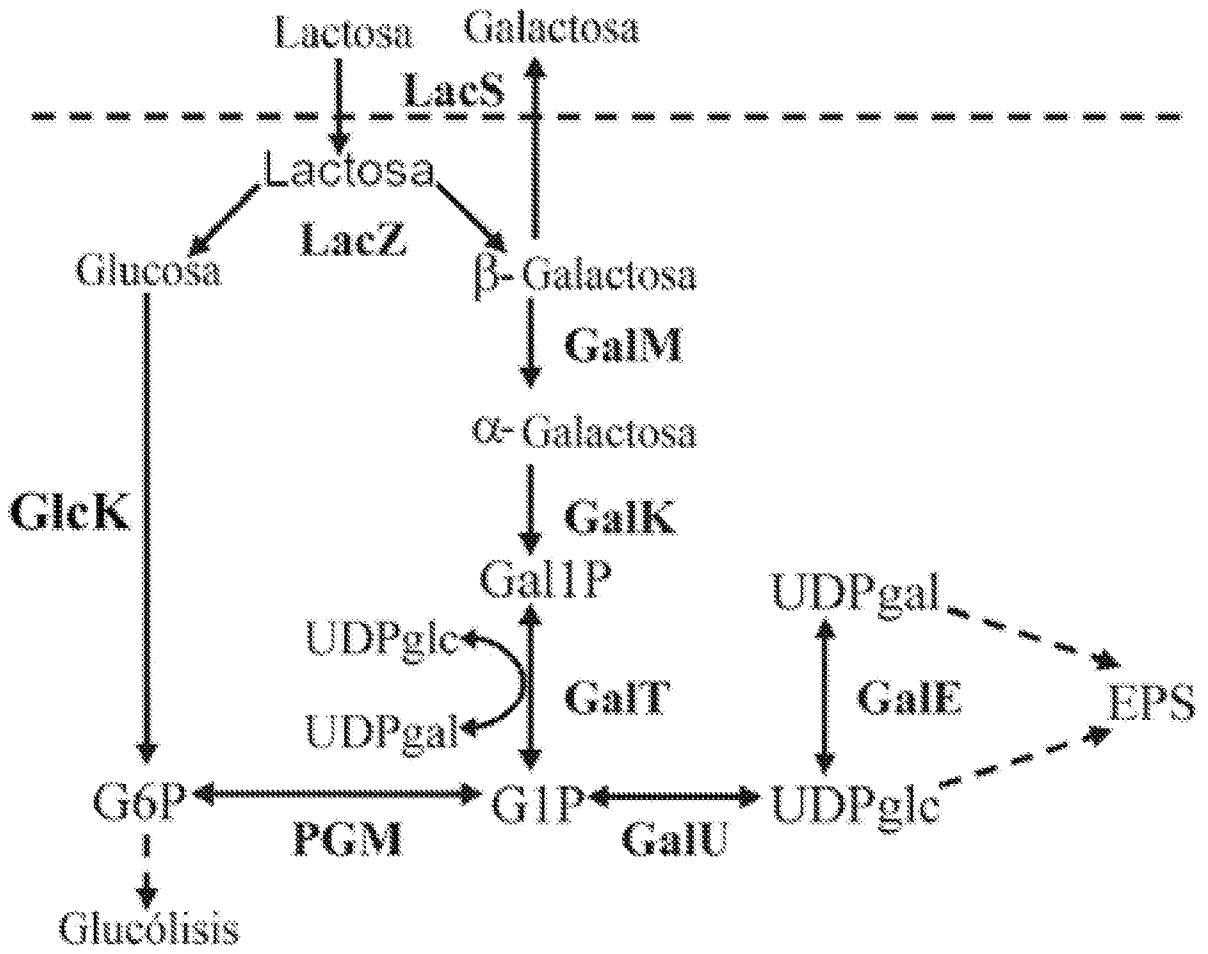


Figura 1

```

MetHisLysLys LeuLeuGly IleAspLeu GlyGlyThrThr ValIysPhe GlyIleLeu ThrAlaAspGly GluValGln GluLysTrp AlaIleGluThr
1  ATGAGTAAAG AACGCTTAGG TATTGTTTGT GGTGGAAAGG TTTTAAAGTT TGGATTTTGG AATGGAGATG GGTAAAGTCA AGAAAAATGG GGTGTTGAAA

CAsnThrHis GluAsnGly SerHisIleVal ProAspTle ValGluSer LeuLysHisArg LeuGluLeu IysGlyLeu ThrAlaGluAsp PheIleGly
101  GAAATAGTTC GCAAAATGCG AATGAGACTG TTTGTTAAAT TTTAAAGTAT TTTAAAGAGC CTTTCAAAAT GATGCACTT AATGCTAAG ATTTTATTTC

Ero
CLeuTyrMet GlySerProTyr AlaValAsp ArgGluSer IysThrValThr GlyAlaPhe AsnLeuSer TrpAlaGluThr HisGluVal GlySerVal
201  AATGAGTATG GAATGCTGAG TGGAGATTGA CCGAGAAAAT AAACAGTAA GGGTGGCTT TAACTGAAG TGGGAGAA CCAAGAAAT TGGGCTGCTC

CHCC15887
C
IleGluLysGlu LeuGlyIle ProPheAla IleAspAsnAsp AlaAsnVal AlaIleLeu GlyGluArgTrp ValGlyAla GlyAlaSer AsnArgAsnVal
301  APTGAAAAAG AATGCTGAT TCAATGCTG AAGGATAAAG AATGAAAGT GCGTCAATC GATGAACTT GCGTGGTCC TGGGCTAAG AATGCTGATC

Ile
VVaiThrLeu ThrLeuGly ThrGlyValGly GlyGlyVal IleAlaAsp GlyAsnLeuIle HisGlyVal AlaGlyAla GlyGlyGluIle GlyAlaSer
401  TTTTAAAGT AACATGCGT AATGCTGCTG GGGGAGTCTT TATGCTGTTT GATAATTTAA TTTATTTTGG TCGGCTGCTT GGGGAGAAA TTTGCTGATX

CHCC15757
T
GluValGln ProAspThrGly PheGluLys ThrCysGly AsnLysGlyLys LeuGluThr ValAlaSer AlaIleGlyIle ValArgVal AlaIleHis
501  TATGCTGAAA CTTTAAAGAG GATTTTAAAT TACTGCGGAA AATAGAAAG GGTGAGAAAT TATGCTGCA GAAAGATCA TGGCACTTAT AATGCTGATC

LeuAlaGluLys CysGluGly AsnSerSer IleLysAlaAla ValAspAsn GlyGluPhe ValThrSerLys AspIleIle ValAlaAla ThrGluCysAsp
601  TTTGAGAAA AATGCTGAGT AATGCTGCTG ATTTAAAGTT CTTTAAAGAA TTTTAAAGTT GATGAAATTA AATGCTGATC AATGCTGCTG AATGCTGCTG

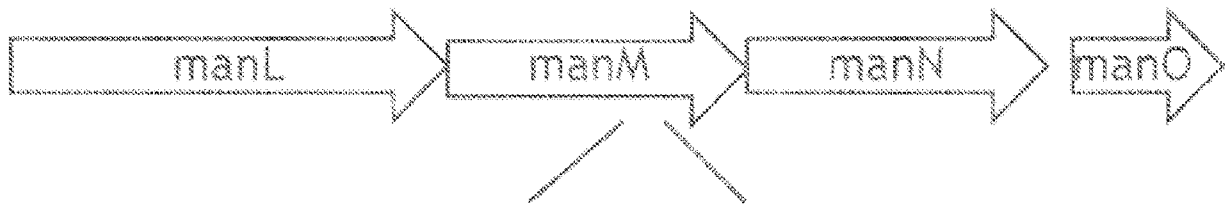
AlaPheAla AspSerIle ValAspLysVal SerLysTyr LeuGlyLeu AlaIleAlaAsn IleSerAsn IleLeuAsn HisAspSerVal ValIleGly
101  ATAAATTTGC TGAGAGCAAT TTTTAAAGT TTTTAAAGT CTTTAAAGT GATGAGAAA AATGCTGAAA GATTTTAAAG GAAATGCTG TTTTAAAGT

GlyGlyVal SerAlaAlaGly GluPheLeu ArgSerArg ValGluGlyTyr PheIleAla CysAlaPhe ProGluValArg ArgThrThr LysValLys
501  TCGGCTGCTT CTTTAAAGT GATGAGTCTG TTTTAAAGT TTTTAAAGT AATGCTGAAA AATGCTGAAA GATTTTAAAG GAAATGCTG CCGGCTGCTT

LeuAlaGluLeu GlyAsnAsn AlaGluIle IleGlyAlaAla SerLeuAla TyrSerIle AspLys* (SEQ ID NO. 2)
601  TTTTAAAGT TTTTAAAGT TTTTAAAGT AATGCTGCTG GATGAGTCTG TTTTAAAGT GATGAGTCTG AATGCTGAAA (SEQ ID NO. 1)

```

Figura 2



209

CHCC15757...ATGGCTACTCGTGAAGTTGG..

CHCC16404...ATGGCTACTCGTTAA

Met Ala Thr Arg *

Figura 3

ES 2 765 177 T5

```

M S D M S I I S A I L V V A V A F L A G
-----
1  ATGTCAGATA TGTCAATTAT TTCTGCGATT TTGGTCGTAG CTGTTGCOCTT CCTTGCTGGT
   L E S I L D Q F Q F H Q P L V A C T L I
-----
61  CTTGAAAGTA TCCTTGACCA ATTCCAATTC CACCAACCAC TTGTTGCATG TACCCTCATC
   G A A T G N L T A G I M L G G S L Q M I
-----
121 GGTGCTGCCA CAGGTAACCT CACTGCAGGT ATCATGCTTG GTGGTTCTCT TCAAATGATT
   T L A W A N I G A A V A P D V A L A S V
-----
181 ACCCTTGCTT GGGCAAACAT CGGTGCTGCC GTAGCTCCTG ACGTTGCCCT TGCATCTGTT
   A A A I I L V K G G K F T A E G I G V A
-----
241 GCGCTGCCA TCATTTTGGT TAAAGGTGGT AAATTTACAG CTGAAGGTAT CGGTGTTCGG
   I A I A I L L A V A G L F L T M P V R T
-----
301 ATTGCAATAG CTATCCTGCT TGCAGTTGCA GGTCCTTCC TAACTAIGCC TGTTCGTACA
   A S I A F V H A A D K A A E H G N I A G
-----
361 GCATCTATTG CCTTTGTTCA TGCTGCAGAT AAAGCTGCAG AACACGGAAA CATCGCTGGT
-----
   V E R A Y Y L A L L L Q G L R I A V P A
-----
421 GTTGAACGTG CATACTACCT CGCTCTCCTT CTTCAGGTT TCGGTATTGC TGTGCCAGCA
   A L L L A I P A Q S V Q H A L G L M P D
-----
481 GCCCTTCTTC TTGCCATCCC GGCCCAATCT GTTCAACATG CCCTTGGCTT GATGCCTGAC
   W L T H G L V V G G G M V V A V G Y A M
-----
541 TGGCTCACCC ATGGTTTGGT TGTCGGTGGT GGTATGGTCG TAGCCGTGG TTACGCCATG
   I I N M M A T R E V W P F F A I G F A L
-----
601 ATTATCAATA TGATGGCTAC TCGTGAAGTT TGGCCATTCT TCGCCATTGG TTTTGCTTTG
CHCC16404                                     T
-----
A A I S Q L T L I A L S T I G V A I A F
-----
661 GCAGCAATTA GCCAATTGAC ACTTATCGCT CTTAGTACCA TTGGTGTTC CATCGCCTTC
   I Y L N L S K Q G G G N G G G N G G G T
-----
721 ATCTACCTCA ACCTTTCTAA ACAAGGTGGC GGAAATGGTG GCGGAAATGG TGGCGGAACT
   S S G S G D P I G D I L E D Y (SEQ ID NO.6)
-----
781 TCATCTGGTT CAGGCGACCC AATCGGCGAT ATCTTGGGAAG ACTAC (SEQ ID NO.5)

```

Figura 4