



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0611332-0 A2**

(22) Data de Depósito: 30/05/2006
(43) Data da Publicação: 31/08/2010
(RPI 2069)



(51) *Int.Cl.:*
A23C 9/123
C07K 14/315

(54) Título: **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UMA CEPA MUTANTE DE BACTÉRIA LÁCTICA, REFERIDA CEPA, FERMENTO LÁCTICO, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UM PRODUTO DE LEITE FERMENTADO, E REFERIDO PRODUTO DE LEITE FERMENTADO**

(57) Resumo: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UMA CEPA MUTANTE DE BACTÉRIA LÁCTICA, REFERIDA CEPA, FERMENTO LÁCTICO, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UM PRODUTO DE LEITE FERMENTADO, E REFERIDO PRODUTO DE LEITE FERMENTADO. A presente invenção é relativa a cepas de bactérias lácticas nas quais a histidina fosforilável do domínio IIA da lactose permease é substituída por um ácido aminado não fosforilável. Essas cepas possuem uma pós-acidificação reduzida e são utilizáveis notadamente para a preparação de produtos do leite fermentados.

(30) Prioridade Unionista: 31/05/2005 FR 05 05497

(73) Titular(es): COMPAGNIE GERVAIS DANONE

(72) Inventor(es): Anne Druesne, Jean-Michel Faurie, Nadine Licau, Peggy Garault

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006062715 de 30/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/128864 de 07/12/2006

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UMA CEPAS MUTANTE DE BACTÉRIA LÁCTICA, REFERIDA CEPAS, FERMENTO LÁCTICO, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UM PRODUTO DE LEITE FERMENTADO, E REFERIDO PRODUTO DE LEITE FERMENTADO".

5 A presente invenção refere-se ao domínio da fermentação do leite. Mais precisamente, essa invenção se refere aos novos mutantes de *streptococcus thermophilus* expressando uma lactose permease mutante, cuja atividade de transporte da lactose é modificada. Essas cepas e fermentos que as compreendem podem ser utilizados para a obtenção de produtos
10 do leite fermentados, possuindo boas propriedades de conservação.

Os iogurtes (ou yoghourts) são tradicionalmente obtidos por fermentação do leite com uma associação de diferentes bactérias lácticas, escolhidas dentre as cepas de *streptococcus thermophilus* e de *Lactobacillus bulgaricus*. No decorrer da fermentação que é feita a uma temperatura de aproximadamente 40 a
15 45°C, essas bactérias utilizam principalmente a lactose como substrato energético, e produzem o ácido láctico que acarreta a coagulação do leite; quando o pH atinge um valor de aproximadamente 4,8 a 4,5, coloca-se fim a essa etapa de fermentação (também denominada "acidificação"), resfriando-se o produto. Este é em seguida mantido no frio durante a seqüência do processo de fabricação e de acondi-
20 cionamento, e até seu consumo.

Todavia, o resfriamento não pára completamente a fermentação láctica; mesmo quando o produto é mantido a 4°C, observa-se um aumento progressivo de sua acidez no decorrer do tempo.

Esse fenômeno, conhecido pelo nome de pós-acidificação, é
25 responsável por uma degradação das qualidades organolépticas do produto durante sua conservação.

A pós-acidificação resulta essencialmente da utilização, pelas bactérias, da lactose restante no produto oriunda da etapa de acidificação controlada. Para evitá-la, foi proposta a utilização de cepas de bactérias lác-
30 ticas que não fermentam, ou fermentam muito pouco, a lactose.

As enzimas essenciais para a fermentação da lactose no *strep-
tococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* são codificadas pelo opé-

ron lactose, que contém o gene lacS, codificando para a lactose permease, e o gene LacZ, codificando para a β -galactosidase. Essas proteínas são respectivamente responsáveis pelo transporte e pela hidrólise da lactose. Foi portanto proposto, para serem obtidas cepas não pós-acidificantes de bactérias lácticas, produzir variantes artificiais, ou selecionar mutantes naturais, nos quais a atividade de pelo menos uma dessas enzimas era afetada.

A Patente EP 1078074 (Compagnie Gervais Danone) se refere aos mutantes de *Lactobacillus bulgaricus* deficientes em atividade β -galactosidase, compreendendo uma mutação **non-sens** em pelo menos um dos genes do opéron lactose. Essa patente descreve mais especificamente um mutante, cuja análise faz aparecer duas mutações pontuais: uma, introduzindo um códon de terminação no gene da β -galactosidase, que induz a incapacidade desse mutante a utilizar a lactose; a outra mutação induz uma mudança de ácido aminado ao nível do gene da permease (Lys \rightarrow Asn em posição 122); EP 1078074 não relata nenhum efeito dessa mutação sobre o fenótipo do mutante.

WO0188150 descreve mutantes de uma cepa de *Lactobacillus*. Esses mutantes são incapazes de utilizar a lactose, mas conserva, a capacidade de expressar a β -galactosidase. WO0188150 não precisa a natureza ou a posição da mutação referida, e indica simplesmente que ela pode se situar em um dos genes de estrutura do opéron lactose, por exemplo a permease, ou em uma região de regulação do opéron lactose, ou em um gene que intervém no controle da expressão do opéron lactose.

Os mutantes descritos nos documentos citados acima têm em comum a propriedade de serem completamente incapazes de utilizarem a lactose. Eles só podem crescer sobre leite, se este for complementado com um açúcar diferente da lactose, geralmente glicose. As propriedades de acidificação e de pós-acidificação desses mutantes são controladas pela quantidade de glicose acrescentada.

A fim de fornecer uma alternativa a esses mutantes, os inventores pesquisaram, se era possível obter cepas de bactérias lácticas tendo, por um lado, uma capacidade de utilizar a lactose durante seu crescimento

comparável àquele das cepas selvagens, e, por outro lado, uma aptidão restrita à utilização de lactose no decorrer da fase estacionária, de forma a diminuir ou abolir o fenômeno de pós-acidificação. Com essa finalidade, eles se interessaram pela possibilidade de agir sobre a regulação do transporte da lactose nas células de bactérias lácticas, e notadamente nas células de *streptococcus thermophilus*.

O transporte da lactose extracelular em células de *streptococcus thermophilus* é feito por intermédio da lactose permease LacS. Esse transporte da lactose é feito em symport com um próton, ou em antiporto com a galactose intracelular resultante da degradação da lactose.

O transporte da lactose é dependente de dois fenômenos: por um lado, o estado de fosforilação da lactose permease e, por outro lado, a expressão do gene LacS, codificando para essa lactose permease. Esses dois aspectos são detalhados abaixo.

15 Fosforilação da lactose permease

A proteína LacS é composta de um domínio de translocação e de um domínio de regulação (IIA). Esses domínios contêm diferentes resíduos histidina, cuja fosforilação intervém na regulação do transporte de lactose. Notadamente, o domínio IIA é fosforilável sobre a histidina 552. Essa fosforilação é feita pela proteína HPr (histidina-containing phosphocarrier protein), ela própria previamente fosforilada.

HPr pode ser fosforilada:

- sobre uma serina por uma proteína quinase ATP dependente; a reação inversa de hidrólise de HPr(Ser-P) é catalisada por uma atividade fosfatase (HPr(Ser-P) fosfatase);

- sobre uma histidina HPr(His~P), por um grupamento fosforila proveniente do fosfenolpiruvato, e por intermédio da enzima I (EI).

Só a forma de HPr fosforilada sobre a histidina permite a fosforilação da lactose permease sobre a histidina 552.

Foi observado, sobre um modelo in vitro de proteolipossomas reconstituindo o meio ambiente membranário da proteína LacS e sua fosforilação por HPr(His~P), que essa fosforilação não tem efeito sobre o transpor-

te da lactose em *symport* com um próton (Gunnewijk and Poolman, 2000a), mas aumenta de um fator 2 aproximadamente, o fluxo da troca lactose/galactose.

Transcrição do gene lacS

5 A transcrição do opéron lactose é induzida pelo crescimento em meio lactosado. O promotor dos genes lacS e Z contém um portal cre (*catabolite responsive element*) que permite uma regulação por CcpA : CcpA reprime a expressão de lacS e de lacZ. CcpA tem, ao contrário, um efeito ativador sobre a transcrição do gene codificando para a lactato desidrogenase
10 (*van den Bogaard et al.*, 2000).

A forma HPr(Ser-P) é capaz de interagir com CcpA. Essas proteínas juntas irão permitir formar um complexo com cre, o que acarreta uma repressão da transcrição do gene LacS (Jones et al., 1997).

Foi observado (Gunnewijk and Poolman, 2000b) que a forma
15 HPr(Ser-P) é dominante no começo da fase exponencial de crescimento das culturas de *streptococcus thermophilus* e diminui no decorrer desta, enquanto que a forma HPr(His ~P) aparece no decorrer da fase exponencial e é máxima à entrada em fase estacionária. A passagem de HPr(Ser-P) a HPr(His~P) é feita em paralelo da diminuição da lactose do aumento da galactose no meio de cultura, e um aumento muito grande da expressão da lactose permease.
20

Assim, o estado de fosforilação da proteína HPr parece exercer um papel na regulação do transporte da lactose, compensando a diminuição da lactose no meio, através de, por um lado, o nível de expressão da proteína LacS e, por outro lado, a regulação de sua atividade.
25

Com base nas observações relatadas acima, Gunnewijk e Poolman propuseram o seguinte modelo: quando a lactose é abundante no meio, a expressão do gene lacS é reprimida pelo complexo HPr(Ser-P)/CcpA. No decorrer da fermentação, o acúmulo de galactose no meio e a diminuição da lactose disponível provocam uma diminuição da capacidade da bactéria a fazer penetrar a lactose (e, portanto, uma diminuição da acidificação do meio).
30 Essa diminuição acarreta uma baixa da atividade glicolítica, e uma queda da

concentração em ATP, assim como uma alta da concentração em fosfato inorgânico, acarretando uma baixa da atividade de HPr(Ser-P) quinase em proveito da atividade de HPr(Ser-P) fosfatase, o que teria por efeito a diminuição da concentração em HPr(Ser-P). Essa diminuição da concentração em HPr(Ser-P) permite levar a repressão catabólica do gene lacS e, por conseguinte, aumentar a produção de lactose permease. Paralelamente, o aumento de HPr(His~P) permitiria aumentar a fosforilação da lactose permease sobre a histidina 552 e, portanto, a capacidade de transporte da lactose por *antiport* com a galactose.

10 Esse modelo, sugerindo que a fosforilação da lactose permease sobre a histidina 552 por HPr(His~P) aumenta o fluxo de lactose nas células, quando a quantidade de substrato no meio diminui, permite supor que a acidificação em fim de fase exponencial poderia ser diminuída, caso se impedisse essa fosforilação. Todavia, ele é baseado em parte em experiências *in vitro*, e não permite pré-julgar a parte real *in vivo* do aumento da fosforilação da lactose permease, em relação ao aumento de sua expressão, na importação da lactose *in vivo*. Além disso, as observações referentes aos efeitos da concentração em HPr(Ser-P) e HPr(His~P) sobre o aumento da expressão e da fosforilação de LacS foram feitas sobre bactérias em fase exponencial ou em começo de fase estacionária; nenhuma indicação é fornecida no que se refere às concentrações dessas duas formas de HPr em estágios mais avançados da fase é acionária.

25 As únicas informações disponíveis quanto ao efeito da ausência de fosforilação de LacS sobre a histidina 552 são fornecidas em uma publicação de Poolman et al. (Poolman et al., 1992), que descreve diferentes plasmídeos contendo a seqüência codificando para a enzima LacS de *streptococcus thermophilus*, mutada sobre diferentes resíduos histidina. Esses plasmídeos são utilizados para transformar uma cepa de E.coli na qual o gene lacS endógeno foi previamente deletado. O transporte da lactose nas 30 cepas transformadas pelos diferentes mutantes é avaliado em relação àquele observado na mesma cepa de E.coli contendo um plasmídeo codificando para a enzima LacS selvagem de *streptococcus thermophilus*. Nenhuma di-

ferença significativa foi observada no que se refere ao mutante H552R, no qual a histidina

Nativa é substituída por um arginina. Poolman et al. atribuem esse resultado seja à ineficácia da fosforilação da enzima LacS selvagem de *streptococcus thermophilus* por HPr(His~P) de E.coli, seja ao fato de essa fosforilação não exercer papel no transporte da lactose.

Os inventores pesquisaram, todavia, se uma mutação prevendo a fosforilação de LacS sobre o resíduo histidina poderia ter um efeito sobre as propriedades de acidificação e de pós-acidificação da bactéria mutante.

Eles escolheram para esse estudo uma cepa industrial de *streptococcus thermophilus*. Essa cepa, depositada na CNCM em 12 de dezembro de 2002, sob o número I-2967, permite obter produtos leiteiros fermentados tendo uma textura interessante; todavia, essa cepa leva a uma pós acidificação importante.

Os inventores produziram e caracterizaram um mutante dessa cepa, expressando, no local da lactose permease selvagem, uma lactose permease mutada, não fosforilável sobre a histidina 552.

Constataram que essa cepa mutante possuía uma curva de acidificação diferente daquela da cepa mãe. A acidificação aciona mais lentamente no caso do mutante que naquele da cepa mãe, e velocidade máxima de acidificação do mutante é menos elevada. Todavia, um pH equivalente é alcançado ao cabo de 6 horas de fermentação para as duas cepas. É ao nível da pós-acidificação que a diferença entre as duas cepas é a mais nítida. Nas mesmas condições de conservação (28 dias de conservação a 10°C), o ΔpH (diferença entre o pH no D0 e o pH no D28) é da ordem de 0,6 no caso da cepa mãe, e da ordem de 0,4 no caso da cepa mutante. Essa diferença de pós-acidificação não provém de uma diferença a nível da sobrevivência das bactérias. Esta é com efeito equivalente para as duas cepas. Além disso, os produtos fermentados obtidos com o mutante apresentam as mesmas qualidades de textura que aqueles obtidos com a cepa mãe.

A presente invenção se refere, portanto, em primeiro lugar, a um processo de obtenção de uma cepa mutante de bactéria láctica, possuindo

uma pós-acidificação mais fraca do que a cepa mãe, da qual ela é oriunda, caracterizado pelo fato de se introduzir no ADN genômico, notadamente no ADN cromossômico, dessa cepa mãe, uma mutação do códon codificando para a histidina fosforilável por HPr(His~P) do domínio IIA da lactose permease, essa mutação induzindo a substituição dessa histidina por um ácido aminado não fosforilável.

De acordo com um modo de realização preferido da presente invenção, essa cepa é uma cepa de *streptococcus thermophilus*, e essa mutação induz a substituição da histidina em posição 552 da lactose permease por um ácido aminado não fosforilável.

Esse ácido aminado não fosforilável pode ser qualquer ácido aminado, com exceção da serina, da tirosina, da histidina e da treonina. De preferência, será escolhida a alanina.

Vantajosamente, o códon codificando para a histidina em posição 552 da lactose permease é substituído por um códon codificando para uma lanina. Essa mutação gera um local de restrição BstUI que facilita a criação dos mutantes obtidos.

O processo, de acordo com a invenção, pode ser aplicado, aplicando-se técnicas conhecidas do técnico.

O ADN mutado assim obtido é em seguida inserido em um vetor que permite a integração do gene no cromossoma bacteriano. Essa integração é feita, de preferência, por recombinação do enxerto portado pelo vetor com a região homóloga do cromossoma bacteriano.

Classicamente, se insere o ADN mutado em um vetor integrativo portanto um marcador de seleção (por exemplo um gene de resistência a um antibiótico), e se introduz esse vetor nas bactérias nas quais se deseja efetuar a mutação. Estas são em seguida cultivadas sobre meio seletivo (por exemplo, se o marcador de seleção é um gene de resistência a um antibiótico, em presença do antibiótico correspondente), e se recuperam as bactérias que são capazes de crescer nessas condições, que são aquelas que integraram o vetor por recombinação homóloga entre o enxerto e a região homóloga do cromossoma bacteriano. A estrutura integrada no cromossoma

é constituída das seqüências do vetor flanqueadas, por um lado, pela seqüência mutada proveniente do enxerto, e, por outro lado, pela seqüência homóloga da bactéria hospedeira.

5 As bactérias assim selecionadas são cultivadas sobre meio não seletivo, a fim de permitir a excisão das seqüências provenientes do vetor, que se efetua por recombinação homóloga entre as regiões flanqueando essas seqüências. A metade das bactérias nas quais essa recombinação ocorreu contém a seqüência "selvagem" proveniente da bactéria hospedeira, e a outra metade contém a seqüência mutada proveniente do enxerto. As
10 bactérias que portam a mutação são em seguida selecionadas por qualquer meio apropriado. Por exemplo, se a mutação cria um local de restrição, a seleção pode ser feita com base na presença desse local de restrição em um produto de amplificação por PCR da região mutante.

Vetores integrativos estão disponíveis para numerosas bactérias
15 lácticas. Classicamente, para uma espécie bacteriana determinada, um vetor integrativo é um vetor que pode ser introduzido nas bactérias dessa espécie, mas que é incapaz de aí se replicar.

A título de exemplos de vetores utilizáveis como vetores integra-
tivos nos *streptococcus thermophilus*, citar-se-ão Pgem5, Puc19 (Mollet et
20 al., 1993), Pnd324 (Duan et al., 1999).

Vantajosamente, para aumentar a eficácia de transformação, pode-se utilizar como vetor integrativo um vetor de replicação condicional na bactéria escolhida. Nesse caso, as bactérias nas quais foi introduzido o vetor são em uma primeira etapa cultivadas em condições permissivas para sua
25 replicação, o que lhe permite se estabelecer nessas bactérias transformadas; em uma segunda etapa as bactérias são cultivadas em condições não permissivas para a replicação do vetor, e pode-se, conforme no caso dos vetores integrativos clássicos, efetuar a seleção das bactérias nas quais o vetor foi integrado no cromossoma.

30 A título de exemplos de vetores de replicação condicional utilizáveis como vetores integrativos em um grande número de bactérias lácticas, serão citados os vetores termoendurecíveis descritos por BISWAS et al. e

MAGUIN et al (Biswas et al., 1993; Maguin et al., 1996), assim como no Pedido PCT WO 93/18164, ou os vetores pww01 (Law et al., 1995) e PuCl22 (Frere et al., 1998).

5 A invenção tem também por objeto uma cepa de bactéria láctica capaz de ser obtida por um processo, de acordo com a invenção.

Essa cepa é caracterizada pelo fato de conter em seu ADN cromossômico, uma mutação do códon codificando para a histidina fosforilável por HPr(His~P) do domínio IIA da lactose permease, essa mutação induzindo a substituição dessa histidina por um ácido aminado não fosforilável.

10 De acordo com um modo de realização preferido da presente invenção, essa cepa é uma cepa de *streptococcus thermophilus*, na qual o gene da lactose permease contém uma mutação, induzindo a substituição da histidina em posição 552 da proteína por um ácido aminado não fosforilável.

15 Uma cepa de bactérias lácticas de acordo com a invenção foi depositada segundo o Tratado de Budapeste, em 10 de maio de 2004, junto à CNCM (Coleção Nacional de Culturas de Microorganismos), 25, rue du Docteur Roux, em Paris, sob o número I-3213. Trata-se de uma cepa mutante de *streptococcus thermophilus*, derivada da cepa CNCM I-2967 (depositada na CNCM, em 12 de dezembro de 2002), pela introdução, por mutagênese dirigida, de uma mutação que substitui o códon histidina 552 por um códon alanina.

25 As cepas de bactérias lácticas, de acordo com a invenção, têm durante sua fase de crescimento uma atividade lactose permease similar àquela da cepa mãe, da qual são oriundas. Elas possuem, portanto, capacidades de assimilação da lactose e de acidificação, comparáveis àquela da cepa mãe da qual são oriundas. Ao contrário, sua atividade lactose permease durante a fase estacionária é reduzida em relação àquela da cepa mãe, o que acarreta uma pós-acidificação reduzida.

30 Vantajosamente, as cepas de bactérias lácticas, de acordo com a invenção, são oriundas de bactérias lácticas possuindo uma atividade β -galactosidase, e conservam essa atividade. Elas podem crescer normalmen-

te sobre o leite não suplementado com um açúcar diferente da lactose.

De preferência, as cepas de bactérias, de acordo com a invenção, são mutantes apropriados à indústria alimentícia (ou mutantes "food-grade"). Eles são vantajosamente derivados de cepas bacterianas caracterizadas pelo fato de apresentarem propriedades vantajosas de fermentação dos produtos leiteiros.

A presente invenção se refere também a um fermento láctico, compreendendo pelo menos uma cepa de bactérias, tal como descrita acima. De acordo com um modo de realização particular, um fermento láctico, de acordo com a invenção, compreende pelo menos uma cepa mutante de *streptococcus thermophilus*, expressando uma lactose permease, da qual a histidina 552 foi substituída por um resíduo não fosforilável, associada a pelo menos uma outra cepa de bactéria láctica, por exemplo uma cepa de *Lactobacillus bulgaricus*, podendo eventualmente possuir também uma pós-acidificação reduzida (por exemplo resultando da mutação, de acordo com a invenção, da lactose permease, ou resultante de uma mutação que inativa a β -galactosidase).

Um processo de preparação de um produto leiteiro fermentado, compreendendo uma etapa no decorrer da qual se fermenta o leite com o auxílio de um fermento láctico, tal como descrito acima, faz também parte integrante da presente invenção, assim como qualquer produto leiteiro fermentado, uma bebida fermentada, um quefir, um queijo ou um leite infantil fermentado.

Os exemplos experimentais que se seguem, ilustrados pelas figuras, expõem mais em detalhes certos aspectos da presente invenção, sem, todavia, limitar-lhe o objeto.

Legenda das figuras

Figura 1: comparação da seqüência do gene lacS do variante I-3213 com a seqüência do gene lacS da cepa mãe I-2967.

Figura 2: comparação das curvas de acidificação obtidas com o mutante I-3213 e a cepa mãe I-2967.

Figura 3: comparação das velocidades de acidificação do mutan-

te I-3213 e da cepa mãe I-2967.

Figura 4: seqüência da acidez Dornic no decorrer da conservação dos produtos. Comparação do mutante I-3213 e da cepa mãe I-2967.

Figura 5: princípio da medida da viscosidade η de um produto.

5 EXEMPLOS

EXEMPLO 1: Produção do mutante

A cepa de partida é a cepa de *streptococcus thermophilus* I-2967, depositada na CNCM em 12 de dezembro de 2002.

Na seqüência do gene lacS, o códon para a histidina 552 (a histidina que é fosforilável) foi substituído por um códon alanina, por dupla recombinação. Além disso, a mutação feita (substituição do segundo nucleotídeo do códon 522 por uma citosina, ao invés de uma adenina) criou no gene um local de restrição BstU1. Isto permitiu selecionar os clones que integraram a mutação desejada no gene LacS.

A estabilidade da mutação foi verificada a partir de um dos clones obtidos (depositado na CNCM em 10 de maio de 2004 sob o número I-3213), por 6 repicagens sucessivas, seguidas da seqüenciação do gene LacS. A figura 1 mostra a comparação da seqüência do gene lacS do variante I-3213 (SEQ ID NO: 2) com aquela do gene lacS da cepa mãe I-2967 (SEQ ID NO:1). A mutação está bem presente: o códon para a histidina 552 codifica daqui para a frente para uma alanina. Não há mutação indesejável, além disso, no gene lacS.

O mutante I-3213 é apropriado à utilização agroalimentar, pois não contém nenhuma seqüência residual do plasmídeo utilizado para integrar a mutação do gene lacS.

EXEMPLO 2: testes fisiológicos feitos sobre o mutante I-3213

A fim de verificar que o mutante I-3213 é menos pós-acidificante que a cepa mãe I-2967, produtos são fabricados em cepa pura e são acompanhados até J+28: acidificação, pós-acidificação, sobrevida, textura.

30 2.A - Protocolo

- revivificação das cepas por 2 transplantes
- preparação de fermentos sobre leite estéril adicionado de ex-

tratos de lêvedo com incubação a 44 °C, até uma acidez de 85°D seja atingida (correspondendo a 10⁸ a 10⁹ UFC/ml)

- inseminação de uma mistura de 120 g de pó de leite cremoso + 930 ml de água + 1 g de peptona de gelatina N3 (Organotechnia), pasteurizado 10 minutos a 95 °C, com 1 % (v.v) de fermento

- incubação em potes em uma estufa a 44°C, até que um pH de 4,65 seja atingido

- parada da fermentação, colocando os potes durante 30 minutos na água gelada

- conservação dos produtos durante 28 dias em câmara fria a 10°C.

2.B - seqüência - Comparação da acidificação pelos mutantes em relação à cepa I-2967

2.B.1. Curvas de acidificação

Grças ao sistema CINAC (CINética de Acidificação, Alliance Instruments), o pH é medido em contínuo no decorrer do tempo. Podem-se assim obter:

- a curva de acidificação de cada cepa

- a derivada primeira em relação ao tempo, que dá a velocidade

de acidificação.

2.B.2. Medida do pH

O acompanhamento da evolução do pH no decorrer da conservação dos produtos é feito graças a um pH-metro MP220 de Mettler Toledo.

2.B.3. Medida da acidez Dornic

A medida da acidez Dornic (D°) permite titular a concentração molar em íons H₃O⁺. O número de graus Dornic corresponde ao número, em décimos de mililitros, de solução hidróxido de sódio, à concentração 0,1 N que são necessários para neutralizar 10,32 g de leite. A neutralidade é visualizada, utilizando um indicador colorido, a fenolftaleína. Nos arredores de sua zona de curva (pH 8,2), a fenolftaleína passa do incolor ao rosa. Um grau Dornic representa 100 mg de ácido láctico por litro de leite.

2.B.4. Preparação do mix para os testes produzidos

Ó meio leite é reconstituído a partir de 120 g de leite em pó cremoso (Milex 240, Arla Food Ingredients) + 930 ml de água permutada + 1 g de peptídeo N3 (Vital Armor 950, Armor 950, Armor Proteínas). O mix é misturado até completa homogeneização. O meio é em seguida reidratado durante 30 minutos à temperatura ambiente, depois pasteurizado a 95°C durante 10 minutos.

2.B.5. Sobrevida das cepas

As medidas de sobrevida são realizadas sobre meio gelosado M17 sacarosado. Isolamento na superfície via um inseminador espiral (WASP de AES). Incubação a 37°C sob H₂CO₂. Leitura após 72 horas de incubação.

As curvas de acidificação em cepas puras foram feitas em duplicata.

2.B.6. Interpretação

Os resultados, apresentados nas figuras 2 e 3, mostram que o mutante I-3213 tem uma curva de acidificação mais lenta do que a cepa mãe, com um efeito uréia mais pronunciada e uma velocidade máxima de acidificação mais baixa. Todavia, o pH 4,50 é atingido em 6 horas para as duas cepas.

2.C- seqüência - Comparação da pós-acidificação do mutante I-3213 em relação à cepa I-2967

A figura 4 mostra os resultados do acompanhamento da acidez Dornic durante a conservação dos produtos, comparando os produtos obtidos por fermentação pelo mutante I-3213 e pela cepa mãe I-2967.

Os resultados referentes à medida do pH imediatamente após parada da fermentação (D0) e após 28 dias de conservação a 10°C, são apresentados na tabela 1 abaixo.

	pH D0	PH D28
I-2967 a	4,65	4,07
I-2967 b	4,64	4,08
I-3213 a	4,60	4,27
I-3213 b	4,65	4,19

TABELA 1

O conjunto desses resultados confirmam que o mutante é menos pós-acidificante que a cepa mãe.

5 2.D - seqüência. Comparação da sobrevida dos mutantes em relação à I-2967

A tabela 2 abaixo indica o número de colônias bacterianas presentes em 1 ml de produto, após 28 dias de estocagem a 10°C.

	UFC/ml D28
I-2967 a	$1,4 \cdot 10^7$
I-2967 b	$7,6 \cdot 10^7$
I-3213 a	$7,4 \cdot 10^7$
I-3213 b	$1,0 \cdot 10^8$

TABELA 2

10 Esses resultados mostram que a sobrevida do mutante é tão boa quanto aquela da cepa mãe, após 28 dias de estocagem, seguindo a parada da fermentação.

15 2.E - seqüência - Comparação da textura dos produtos obtidos a partir de um mutante em comparação com aqueles obtidos a partir da cepa mãe I-2967

As medidas de textura foram feitas sobre os produtos de uma única produção. Todas as medidas foram feitas em triplo (3 potes, por medida).

Três métodos de medida da textura foram feitos sobre os produtos em D+7:

- 20
- Medida de penetrometria com o TAXT2 (10°C)
 - Medida de escoamento após mistura manual sobre o Rhéomat 260 (4°C)
 - Medida de viscosidade sobre o soro, após centrifugação sobre o MCR300 (20°C).

25 Essas diferentes técnicas de medida da textura são detalhadas abaixo.

2.E.1 - Medida de viscosidade sobre o soro dos produtos firmes

O interesse por esse método consiste em analisar o soro dos produtos firmes, a fim de confirmar as caracterizações reológicas dos leites

fermentados pelas cepas.

Esse método de análise permite em uma primeira etapa recuperar o soro dos produtos firmes. Para isso, uma quantidade de produto, aproximadamente 50 g, é centrifugada a 631 g durante 10 minutos à temperatura ambiente, o que permite coletar o soro presente no interior do gel dos leites fermentados pelas cepas. O soro é então retirado e sofre a mesma centrifugação, a fim de eliminar a maioria dos resíduos do produto. O resto dessas partículas se sedimenta para formar um resíduo frágil.

A viscosidade do soro é em seguida medida a 20°C e a um gradiente de cisalhamento fixo de 100 s⁻¹ durante um minuto. Três medidas são também feitas sobre três potes de leite fermentado pela mesma cepa e nas mesmas condições. O aparelho utilizado para essa análise é um reômetro Anton Paar Physica® MCR 300 equipado com uma geometria coaxial com duplos entreferros de tipo DG.26.7/TEZ 150 p-c, assim como de um sistema de regulagem de temperatura com efeito Peltier. Esse sistema rotativo permite avaliar a viscosidade do soro a um gradiente de cisalhamento constante com uma aquisição de um ponto por segundo.

Geralmente, os dois primeiros valores dessa medida são incoerentes e falseados pela inicialização do sistema rotativo. Dessa forma, a viscosidade de cada soro [Vs] é determinada pela média dos valores retidos pelo aparelho, exceto as duas primeiras.

2.E.2- Medida de penetrometria (F_{gel} -D_{gel} -F15 mm)

O aparelho utilizado para essa medida é um penetrômetro Thermo Rhéo TAXT2 (Anton Paar Physica, Áustria).

Um cilindro de aproximadamente 1 cm de diâmetro penetra no gel (temperado a 10°C) à velocidade constante sobre 15 mm de profundidade. Quando da descida do móvel no produto, o gel opõe uma resistência, irá se deformar antes de romper. Mede-se a força que daí resulta.

Os parâmetros extraídos são os seguintes:

F_{gel} = Força de gel (g), corresponde ao valor da força aplicada pelo móvel no momento da ruptura do gel (primeiro pico da curva).

D_{gel} = Distância à força de gel (mm) corresponde à profundida-

de à qual se acha o móvel no momento da ruptura do gel.

F_{15} = Força a 15 mm (g) corresponde à força medida, quando o móvel está em fim de curso.

2.E.3 - Medida de escoamento - Viscosidade escoamento

5 Esse método consiste em determinar a viscosidade dos produtos firmes, após uma mistura manual e uma incubação de 30 minutos a 4°C. Três medidas são feitas a 4°C sobre três potes de leite fermentado pela mesma cepa e nas mesmas condições. O aparelho utilizado para essa análise é um viscosímetro Mettler ® RM260 refrigerado e equipado com um sistema coaxial de tipo DIN 145. Esse sistema rotativo permite observar uma desestruturação do produto em função de um gradiente de cisalhamento linear, seja um esforço com um gradiente determinado.

10 Os resultados são obtidos sob a forma de uma curva de escoamento em contínuo, rampa montante e descendente entre 0 e 20 s⁻¹. O produto sofre um gradiente de cisalhamento crescente de 0 a 20 s⁻¹ durante 1 minuto. Essa fase corresponde à rampa montante. Depois, ele sofre um gradiente de cisalhamento decrescente de 20 a 0 s⁻¹ durante 1 minuto, correspondendo à rampa descendente.

20 Cada curva descendente é em seguida modelizada segundo o modo de Casson:

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_0} + \sqrt{\eta \times D}$$

τ : esforço (Pa)

τ_0 : limite de escoamento do produto (Pa) [Limite 4]

η : viscosidade do produto (Pa.s) [V4]

D: Gradiente de cisalhamento (s⁻¹)

25 Essa modelização por Casson, seguida de uma reta de regressão linear sobre a parte descendente da curva, permite destacar um parâmetro importante que é a viscosidade do produto η , correspondendo à inclinação da reta de regressão.

30 A figura 5 ilustra o modo de cálculo da viscosidade segundo essa modelização.

2.E.4 - Resultados

Os resultados obtidos com cada uma das técnicas de medida são apresentados na tabela 3 a seguir

seqüências	I-2967	I-3213
Visco soro (mPa.s)	2,18	2,31
Fgel (g)	33,58	33,18
Dgel (mm)	3,29	2,96
F 15 mm (g)	39,23	38,78
Viscosidade de escoamento	1154	1171

TABELA 3

5 Análises de variância ($P < 0,05$) são feitas sobre os resultados das medidas de textura (para cada parâmetros os valores são comparados por teste de Student):

- os parâmetros Força de gel, Distância para a força de gel e Força a 15 mm mostram que as duas cepas não são significativamente diferentes;

10 - o parâmetro de viscosidade oriundo da medida de escoamento mostra que as duas cepas não são significativamente diferentes;

- a viscosidade do soro sendo muito reprodutível mostra uma diferença significativa entre as duas cepas, mas o mutante tendo uma viscosidade mais considerável que a cepa I-2967, isto prova que não houve perda de textura.

2.E.5 - Interpretação

As medidas de textura feitas sobre os produtos fermentados obtidos como mutante e a cepa mãe permitem mostrar que não há perda de textura devido à mutação.

20 2.F - Conclusões

Um mutante lactose permease não fosforilável da cepa I-2967 foi obtido por dupla ocorrência de recombinação.

Esse mutante, denominado I-3213, apresenta:

25 - uma curva de acidificação diferente daquela da cepa mãe (velocidade diminuída);

- uma pós acidificação no D28 menos considerável;

- uma textura semelhante àquela da cepa mãe; e

- uma boa sobrevivência no D28.

LISTAGEM DE REFERÊNCIAS

- Biswas, I., Gruss, A., Ehrlich, S.D and Maguin, E. (1993) High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *J Bacteriol*, 175, 3628-3635.
- 5 Duan, K., Liu, C.Q., Liu, Y.J., Ren, J. and Dunn, N.W. (1999) Nucleotide sequence and thermostability of pND324, a 3.6-kb plasmid from *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53, 36-42.
- Frere, J., Benachour, A., Giard, J.C., Laplace, J.M., Flahaut, S. and Auffray, Y. (1998) A new theta-type thermosensitive replicon from *Lactococcus lactis* as an integration vector for *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol Lett*, 161, 107-114.
- 10 Gunnewijk, M.G. and Poolman, B. (2000a) HPr(His approximately P)-mediated phosphorylation differently affects counterflow and proton motive force-driven uptake via the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *J Biol Chem*, 275, 34080-34085.
- 15 Gunnewijk, M.G. and Poolman, B. (2000b) Phosphorylation state of HPr determines the level of expression and the extent of phosphorylation of the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *J. Biol Chem*, 275, 34073-34079.
- 20 Jones, B.E., Dossonnet, V, Kuster, E., Hillen, W., Deutscher, J. and Klevit, R.E. (1997) Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr, *J Biol Chem*, 272, 26530-26535.
- Law, J., Buist, O., Haandrikman, A., Kok, J., Venema, G. and Leenhouts, K. (1995) A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targeted genes. *J Bacteriol*, 177, 7011-7018.
- 25 Maguin, E., Prevost, H, Ehrlich, S.D. and Gruss, A. (1996) Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *J Bacteriol*, 178, 931-935.
- 30 Mollet, B, Knol, J., Poolman, B., Marcisel, O. and Delley, M. (1993) Directed genomic integration, gene replacement, and integrative gene ex-

pression in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*, 175, 4315-4324.

Poolman, B., Modderman, R. and Reizer, J. (1992) Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. The role of histidine residues. *J Biol Chem*, 267, 9150-9157.

- 5 van den Bogaard, P.T., Kleerebezem, M., Kuipers, O.P. and de Vos, W.M. (2000) Control of lactose transport, beta-galactosidase activity, and glycolysis by CcpA in *Streptococcus thermophilus*: evidence for carbon catabolite repression by a nonphosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system sugar. *J Bacteriol*, 182, 5982-5989.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> COMPAGNIE GERVAIS DANONE
 DRUESNE, Anne
 GARAULT, Peggy
 FAURIE, Jean-Michel
 LICAU, Nadine

<120> Cepas mutantes de bactérias lácticas possuindo uma lactose permeasênão fosforilável

<130> MJPmadSLP191/213

<150> FR0505497
 <151> 2005-05-31

<160> 2
 <170> PatentIn versão 3.3

<210> 1
 <211> 1220
 <212> DNA
 <213> Streptococcus thermophilus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (1220)
 <223> Sequência do gene lacS da cepa mãe I-2967

<400> 1

tccacaacct cttgtgttcc ttgttgcctt tatgattatc tctgactcag tagaatatgg	60
tcaatggaaa acgggacacc gtgatgaatc acttactttg tcagttcgtc cacttattga	120
taaacttggg ggtgcatgt caaactggct tgtttctaca ttgcccgtag ctgccggtat	180
gacaacaggt gcctcagcat caacaattac aacacatcaa cagtttatct ttaagcttgg	240
catgtttgct ttcccagcag caacaatgct ttcggtgcc ttcattggtg ctcgtaaaat	300
cactttgact gaagcacgtc acgctaaaat tgttgaagaa ttggaacatc gctttagcgt	360
agcaacttct gaaaatgaag ttaaagctaa cgtcgatatc cttgtaacct ctacaactgg	420
ttatttgggt gatctctcaa gtgtaaatga tgaacacttt gcttcaggta gcatgggtaa	480
aggtttcgcc attaaacct ctgatggagc tgtctttgca ccaattagtg gtaccattcg	540
tcaaattctt cctactcgcc atgcagttgg tattgaaagt gaagatggtg tcattgttct	600

```

tatccacggt ggcacgga cagttaaact taatggtgaa ggattcatta gttacgtaga 660
acaaggtgat catggtgaag ttggacaaaa acttcttgag ttctggtcac caattattga 720
gaaaaatggt cttgatgaca cagtacttgt cactgtaact aattcagaaa aattcagtg 780
tttccatctt gaacaaaaag ttggagaaaa ggtagaagct ttgtctgaag ttattacctt 840
caaaaaagga gaataatcta tgaacatgac tgaaaaaatt caaacttatt taaacgatcc 900
aaagattggt agcgtaata ctgttgatgc tcactcagat cataagtatt ttgaatctct 960
tgaagaatth tctgaagggg agatgaagtt aagacaatct cttaatggaa aatggaaaat 1020
tcactatgct cagaatacaa atcaggtttt aaaagacttt tataaacag aatttgatga 1080
aactgatttg aatttcatca atgtaccagg tcatttagag cttcaaggtt ttggttctcc 1140
acaatatgty aatacccaat atccttggga tggtaaagaa ttccttcgtc cacctcaagt 1200
tcctcaagaa tcaaatgctg 1220

```

<210> 2

<211> 1278

<212> DNA

<213> *Streptococcus thermophilus*

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (1278)

<223> Sequência do gene lacS da variante I-3213

<400> 2

```

cttccaataa tcttgactgc agctgaactc ttcttcattc cacaacctct tgtgttcctt 60
gttgtcttta tgattatctc tgactcagta gaatatggtc aatggaaaac gggacaccgt 120
gatgaatcac ttactttgic agttcgtcca cttattgata aacttggtgg tgcgatgca 180
aactggcttg tttctacatt tgccgtagct gccggtatga caacaggtgc ctcagcatca 240
acaattacaa cacatcaaca gtttatcttt aagcttggca tgtttgcttt cccagcagca 300
acaatgctta tcggtgcctt cattgttgct cgtaaaatca ctttgactga agcacgtcac 360
gctaaaattg ttgaagaatt ggaacatcgc tttagcgtag caacttctga aaatgaagtt 420
aaagctaacg tcgtatctct tgtaaccctt acaactgggt atttggttga tctctcaagt 480
gttaatgatg aacactttgc ttcaggtagc atgggtaaag gtttcgcat taaacctact 540
gatggagctg tctttgcacc aattagtggg accattcgtc aaattcttcc tactcgccat 600
gcagttggta ttgaaagtga agatggtgtc attgttctta tcgcggttgg catcggaaca 660
gttaaactta atggtgaagg attcattagt tacgtagaac aaggtgatca tgttgaagtt 720
ggacaaaaac tcttgagtt ctggtcacca attattgaga aaaatggtct tgatgacaca 780
gtacttgta ctgtaactaa ttcagaaaaa ttcagtgtct tccatcttga acaaaaagtt 840

```

ggagaaaagg tagaagcttt gtctgaagtt attaccttca aaaaaggaga ataatctatg	900
aacatgactg aaaaaattca aacttattta aacgatccaa agattgtag cgtaataact	960
gttgatgctc actcagatca taagtatttt gaatctcttg aagaattttc tgaaggggag	1020
atgaagttaa gacaatctct taatggaaaa tggaaaattc actatgctca gaatacaaat	1080
caggttttaa aagactttta taaaacagaa tttgatgaaa ctgatttgaa tttcatcaat	1140
gtaccaggtc atttagagct tcaaggtttt ggttctccac aatatgtgaa tacccaatat	1200
cctgggatg gtaaagaatt ccttcgtcca cctcaagttc ctcaagaatc aaatgctgtt	1260
gcatcatacg ttaaacad	1278

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção de uma cepa mutante de bactéria láctica possuindo uma pós-acidificação mais fraca que a cepa mãe da qual ela é oriunda, caracterizado pelo fato de se introduzir no ADN genômico da referida cepa mãe uma mutação do códon codificando para a histidina fosforilável por HPr(His~P) do domínio IIA da lactose permeável, a referida mutação induzindo a substituição da referida histidina por um ácido aminado não fosforilável.
5
2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a cepa mãe ser uma cepa de *Streptococcus thermophilus* e em que essa mutação introduzir um códon alanina no lugar do códon histidina 552.
10
3. Cepa de bactéria láctica, caracterizada pelo fato de ser capaz de ser obtida por um processo, como definido na reivindicação 1 ou 2.
15
4. Cepa de bactéria láctica, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de possuir uma atividade β -galactosidase.
20
5. Cepa de bactéria láctica, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de se tratar da cepa mutante de *S. thermophilus*, depositada em 10 de maio de 2004 na CNCM sob o número I-3213.
25
6. Fermento láctico, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos uma cepa de bactérias, como definida em qualquer uma das reivindicações 3 a 5.
30
7. Fermento láctico, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de compreender pelo menos uma cepa mutante de *S. thermophilus*, como definida em qualquer uma das reivindicações 3 a 5, associada a pelo menos uma cepa de *L. bulgaricus*.
8. Processo de preparação de um produto de leite fermentado, caracterizado pelo fato de que compreende uma etapa no decorrer da qual se fermenta leite com o auxílio de um fermento láctico, como definido na reivindicação 6 ou 7.
9. Produto de leite fermentado, caracterizado pelo fato de ser capaz de ser obtido pelo processo, como definido na reivindicação 8.

10. Produto de leite fermentado, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de esse produto ser escolhido dentre os iogurtes, os leites fermentados, as bebidas fermentadas, os quefires, os queijos e os leites infantis fermentados.

```

> I-2967 TCCACAACCTCTTG 14
>I-3213 CTTCCAATAATCTTGACTGCAGCTGAACTCTTCTTCATTCCACAACCTCTTG 52

>I-2967 TGTTCCTTGTTGTCTTTATGATTATCTCTGACTCAGTAGAATATGGTCAATG 66
>I-3213 TGTTCCTTGTTGTCTTTATGATTATCTCTGACTCAGTAGAATATGGTCAATG 104

>I-2967GAAAACGGGACACCGTGATGAATCACTTACTTTGTGTCAGTTCGTCCACTTATT 118
>I-3213 GAAAACGGGACACCGTGATGAATCACTTACTTTGTGTCAGTTCGTCCACTTATT 156

>I-2967 GATAAACTTGGTGGTGCATGTCAAACCTGGCTTGTTCACATTTGCCGTAG 170
>I-3213 GATAAACTTGGTGGTGCATGTCAAACCTGGCTTGTTCACATTTGCCGTAG 208

>I-2967 CTGCCGGTATGACAACAGGTGCCTCAGCATCAACAATTACAACACATCAACA 222
>I-3213 CTGCCGGTATGACAACAGGTGCCTCAGCATCAACAATTACAACACATCAACA 260

>I-2967 GTTTATCTTTAAGCTTGGCATGTTTGCTTTCCAGCAGCAACAATGCTTATC 274
>I-3213 GTTTATCTTTAAGCTTGGCATGTTTGCTTTCCAGCAGCAACAATGCTTATC 312

>I-2967 GGTGCCTTCATTGTTGCTCGTAAAATCACTTTGACTGAAGCACGTACGCTA 326
>I-3213 GGTGCCTTCATTGTTGCTCGTAAAATCACTTTGACTGAAGCACGTACGCTA 364

>I-2967 AAATTGTTGAAGAATTGGAACATCGCTTTAGCGTAGCAACTTCTGAAAATGA 378
>I-3213 AAATTGTTGAAGAATTGGAACATCGCTTTAGCGTAGCAACTTCTGAAAATGA 416

>I-2967 AGTTAAAGCTAACGTCGTATCTCTTGTAAACCCCTACAACCTGGTTATTTGGTT 430
>I-3213 AGTTAAAGCTAACGTCGTATCTCTTGTAAACCCCTACAACCTGGTTATTTGGTT 468

>I-2967 GATCTCTCAAGTGTAAATGATGAACACTTTGCTTCAGGTAGCATGGGTAAAG 482
>I-3213 GATCTCTCAAGTGTAAATGATGAACACTTTGCTTCAGGTAGCATGGGTAAAG 520

>I-2967 GTTTCGCCATTAAACCTACTGATGGAGCTGTCTTTGCACCAATTAGTGGTAC 534
>I-3213 GTTTCGCCATTAAACCTACTGATGGAGCTGTCTTTGCACCAATTAGTGGTAC 572

>I-2967 CATTCGTCAAATTCCTCCTACTCGCCATGCAGTTGGTATTGAAAGTGAAGAT 586
>I-3213 CATTCGTCAAATTCCTCCTACTCGCCATGCAGTTGGTATTGAAAGTGAAGAT 624

>I-2967 GGTGTCATTGTTCTTATCCACGTTGGCATCGGAACAGTTAAACTTAATGGTG 638
>I-3213 GGTGTCATTGTTCTTATCCGCGTTGGCATCGGAACAGTTAAACTTAATGGTG 676

>I-2967 AAGGATTCATTAGTTACGTAGAACAAGGTGATCATGTTGAAGTTGGACAAA 689
>I-3213 AAGGATTCATTAGTTACGTAGAACAAGGTGATCATGTTGAAGTTGGACAAA 727

> I-2967 AACTTCTTGAGTTCTGGTCACCAATTATTGAGAAAAATGGTCTTGATGACA 740
>I-3213 AACTTCTTGAGTTCTGGTCACCAATTATTGAGAAAAATGGTCTTGATGACA 778

>I-2967 CAGTACTTGTCACTGTAACCTAATTCAGAAAAATTCAGTCTTTCCATCTTG 791
>I-3213 CAGTACTTGTCACTGTAACCTAATTCAGAAAAATTCAGTCTTTCCATCTTG 829

>I-2967 AACAAAAAGTTGGAGAAAAGGTAGAAGCTTTGTCTGAAGTTATTACCTTCAA 843
>I-3213 AACAAAAAGTTGGAGAAAAGGTAGAAGCTTTGTCTGAAGTTATTACCTTCAA 881

>I-2967 AAAAGGAGAATAATCTATGAACATGACTGAAAAAATTCAACTTATTTAAAC 895
>I-3213 AAAAGGAGAATAATCTATGAACATGACTGAAAAAATTCAACTTATTTAAAC 933

>I-2967 GATCCAAAGATTGTTAGCGTTAATACTGTTGATGCTCACTCAGATCATAAG 946
>I-3213 GATCCAAAGATTGTTAGCGTTAATACTGTTGATGCTCACTCAGATCATAAG 984

```

Fig.1

>I-2967 TATTTTGAATCTCTTGAAGAATTTTCTGAAGGGGAGATGAAGTTAAGACAAT 998
>I-3213 TATTTTGAATCTCTTGAAGAATTTTCTGAAGGGGAGATGAAGTTAAGACAAT 1036

>I-2967 CTCTTAATGGAAAATGGAAAATTCACTATGCTCAGAATACAAATCAGGTTTT 1050
>I-3213 CTCTTAATGGAAAATGGAAAATTCACTATGCTCAGAATACAAATCAGGTTTT 1088

>I-2967 AAAAGACTTTTATAAAACAGAATTTGATGAAACTGATTTGAATTTTCATCAAT 1102
>I-3213 AAAAGACTTTTATAAAACAGAATTTGATGAAACTGATTTGAATTTTCATCAAT 1140

>I-2967 GTACCAGGTCATTTAGAGCTTCAAGGTTTTGGTTCTCCACAATATGTGAATA 1154
>I-3213 GTACCAGGTCATTTAGAGCTTCAAGGTTTTGGTTCTCCACAATATGTGAATA 1192

>I-2967 CCCAATATCCTTGGGATGGTAAAGAATTCCTTCGTCCACCTCAAGTTCCTCA 1206
>I-3213 CCCAATATCCTTGGGATGGTAAAGAATTCCTTCGTCCACCTCAAGTTCCTCA 1244

>I-2967 AGAATCAAATGCTG 1220
>I-3213 AGAATCAAATGCTGTTGCATCATACGTTAAACAT 1278

Fig.1(continação)

Fig.2

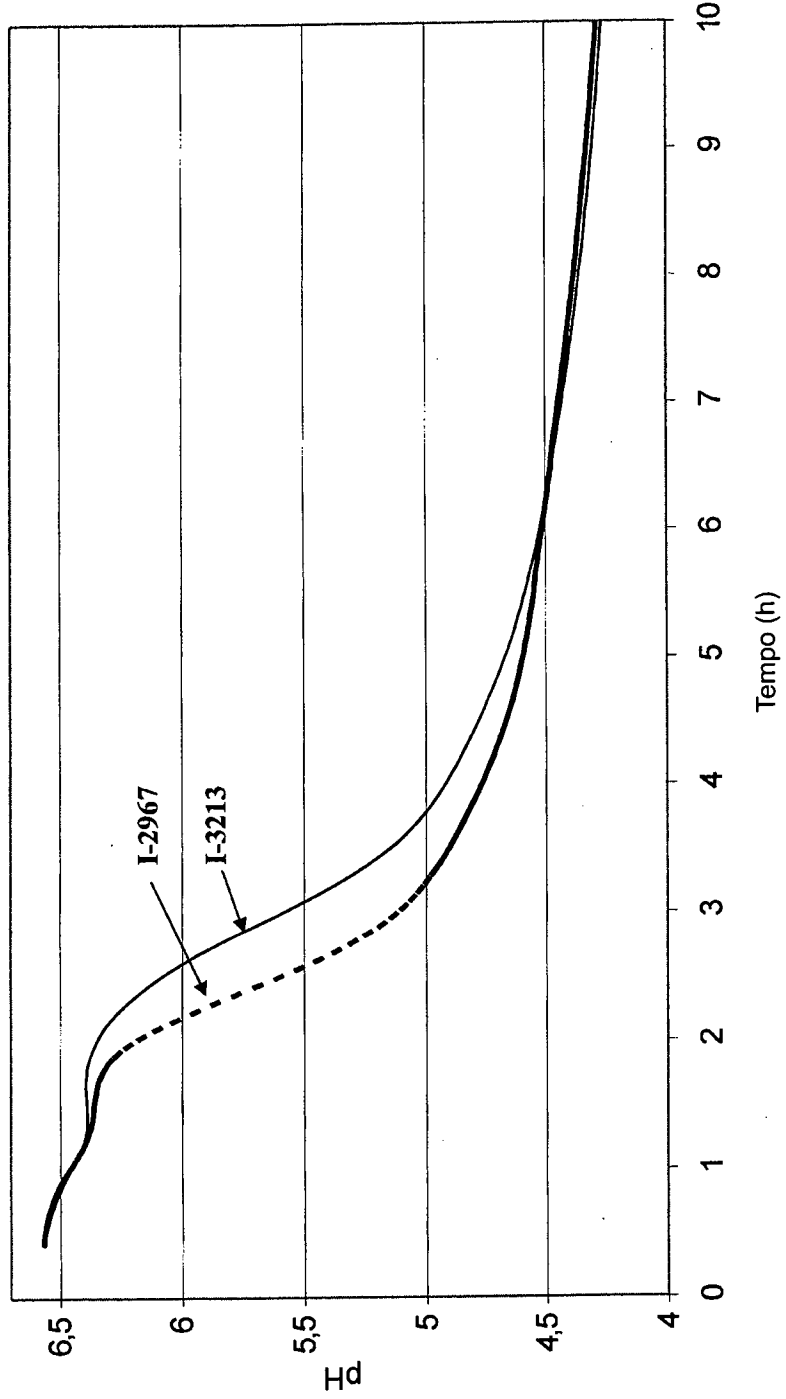


Fig.3

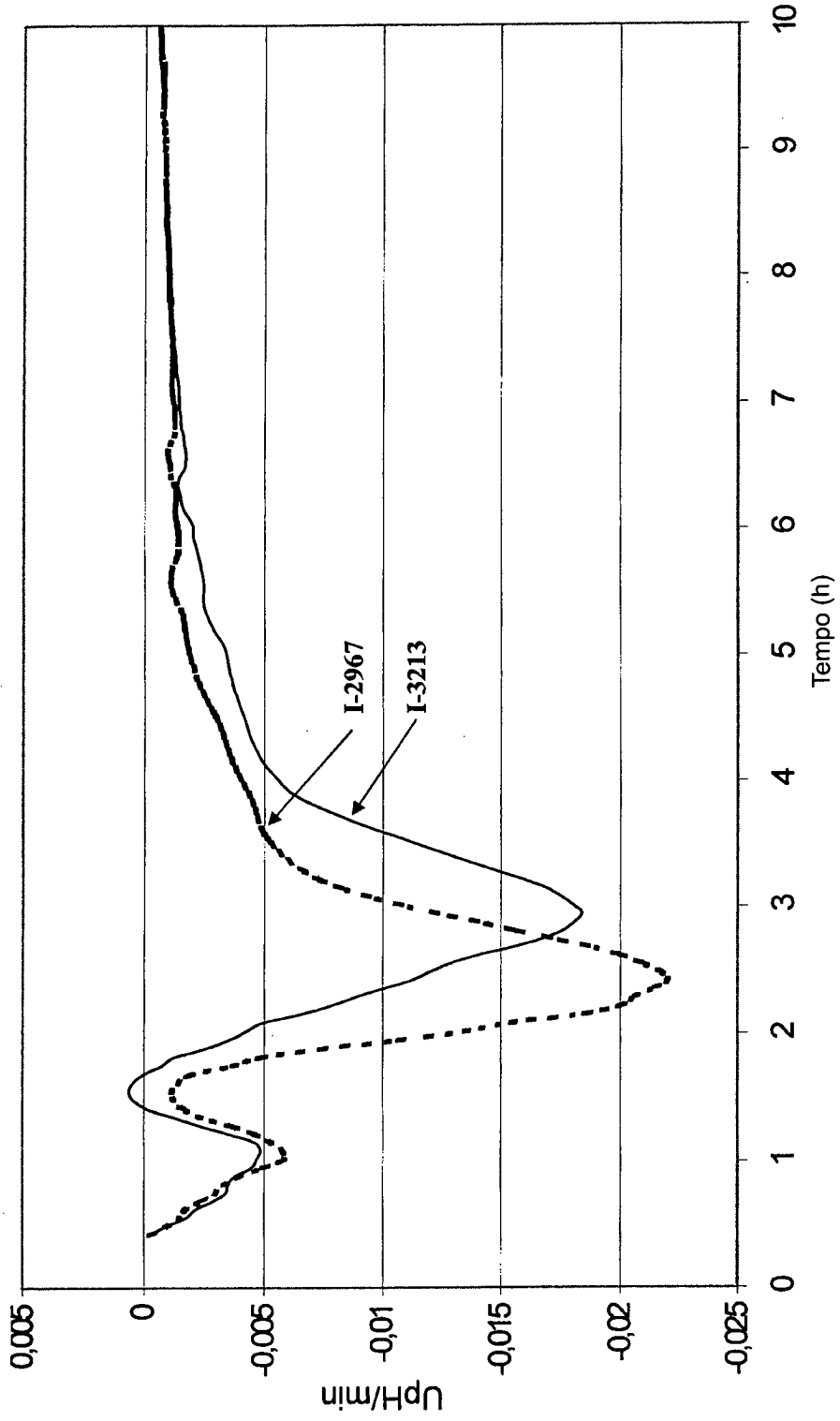


Fig.4

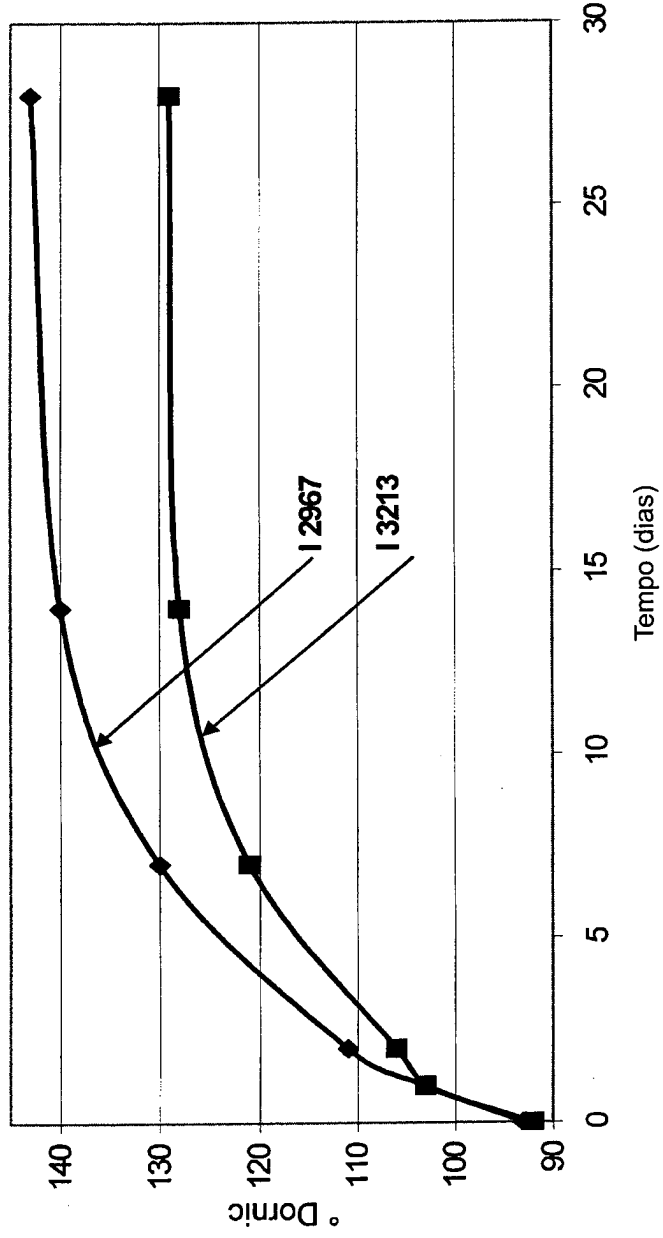
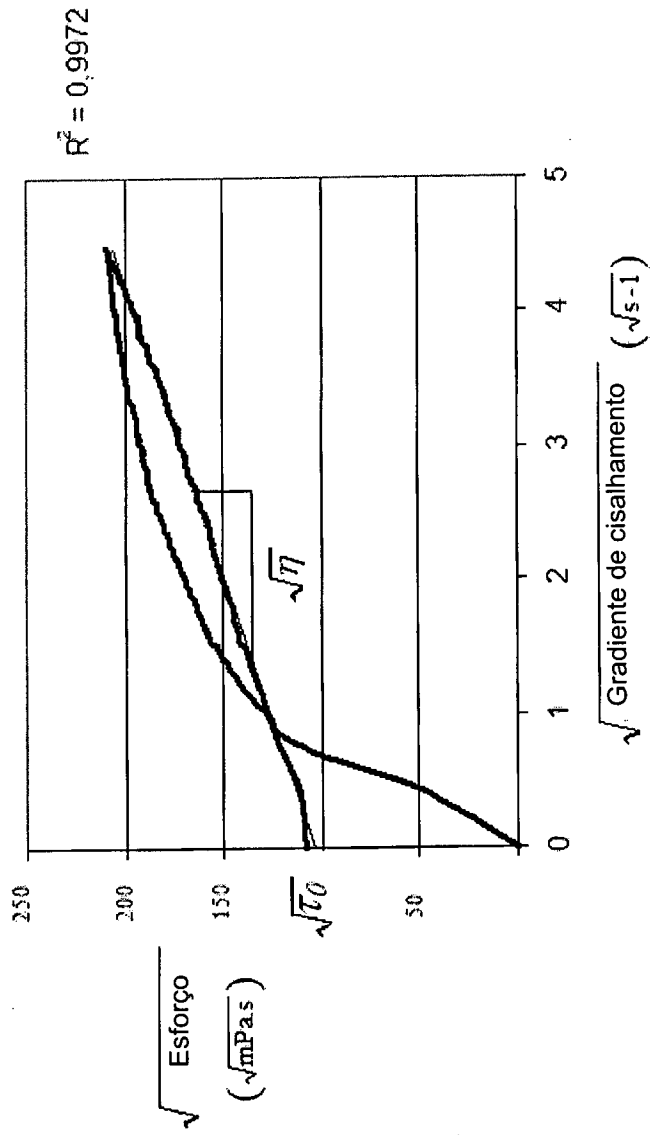


Fig.5



RESUMO

Patente de Invenção: **"PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UMA CEPA MUTANTE DE BACTÉRIA LÁCTICA, REFERIDA CEPA, FERMENTO LÁCTICO, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UM PRODUTO DE LEITE FERMENTADO, E REFERIDO PRODUTO DE LEITE FERMENTADO"**.

A presente invenção é relativa a cepas de bactérias lácticas nas quais a histidina fosforilável do domínio IIA da lactose permease é substituída por um ácido aminado não fosforilável. Essas cepas possuem uma pós-acidificação reduzida e são utilizáveis notadamente para a preparação de produtos do leite fermentados.