



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 345 965**

51 Int. Cl.:
C12N 1/20 (2006.01)
A23C 19/032 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99931021 .2**
96 Fecha de presentación : **02.07.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1102837**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.05.2001**

54 Título: **Método de prevención de infección bacteriófaga de cultivos bacterianos.**

30 Prioridad: **03.07.1998 DK 1998 00878**
06.07.1998 US 91735 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.10.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.10.2010

73 Titular/es: **Chr. Hansen A/S**
Boege Alle 10-12, P.O. Box 407
2970 Hoersholm, DK

72 Inventor/es: **Nilsson, Dan y**
Janzen, Thomas

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 345 965 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de prevención de infección bacteriófaga de cultivos bacterianos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de cultivos bacterianos que se usan industrialmente en la fabricación de p. ej. productos alimenticios o productos de metabolito útiles. En particular se proporcionan cepas bacterianas modificadas, que, cuando son cultivadas en un material de sustrato seleccionado, no son susceptibles al ataque por bacteriófagos, y han retenido su capacidad de ser metabólicamente activas.

Antecedentes técnicos y técnica anterior

Los fallos de producción de cultivos bacterianos provocados por infección por bacteriófagos se consideran como uno de los problemas más importantes en el uso industrial de cultivos bacterianos. Los bacteriófagos se han encontrado para muchas de las cepas bacterianas usadas en la industria, tal como especies de bacterias del ácido láctico p. ej. *Lactococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, y *Streptococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Staphylococcus spp.* o *Micrococcus spp.* Además, las infecciones por bacteriófagos también son bien conocidas en otras especies industrialmente útiles tales como la *Bacillus spp.*, *Enterobacteriaceae spp.* incluyendo *E. coli*, *Corynebacterium spp.*, *Actinomyces spp.* y *Brevibacterium spp.*

En la industria alimentaria, los cultivos iniciadores bacterianos del ácido láctico son usados ampliamente para las fermentaciones alimenticias. Parece que entre los elementos de las bacterias del ácido láctico *Lactococcus spp.* son las más devastadas por infecciones por bacteriófagos. Un factor, que da lugar a infecciones por bacteriófagos frecuentes en cultivos iniciadores bacterianos del ácido láctico es el hecho de que las condiciones de fermentación en la industria alimentaria incluyendo la industria láctea son generalmente no estériles. Así, aún no ha sido posible eliminar la contaminación por bacteriófagos bajo estas condiciones industriales.

El desarrollo lítico de los fagos implica la adsorción de los fagos a la superficie de la célula huésped, inyección de ADN del fago en el interior de la célula, síntesis de proteínas del fago, réplica del ADN del fago, ensamblaje de fagos de la progenie y liberación de progenie del huésped. Mecanismos mediados por células de interferencia con cualquiera de estos eventos puede prevenir una infección por fago. La capacidad de los cultivos bacterianos de resistir la infección por bacteriófagos durante el uso industrial depende en gran parte de las características de la cepa huésped afectando uno o más de los mencionados mecanismos.

Así, se ha demostrado que los mecanismos de resistencia o de defensa naturales a los bacteriófagos existen en cepas bacterianas que aseguran un cierto nivel de protección contra el ataque por bacteriófagos. Estos mecanismos de defensa natural incluyen la inhibición de adsorción del fago, prevención de penetración de ADN del fago, restricción del ADN del fago e infección abortiva.

La prevención de contacto productivo entre fagos y células bacterianas debido a los alterados receptores de la superficie celular para fagos reduce inmensamente la capacidad de los fagos de atacar las células. La adsorción de los fagos a la superficie celular no es siempre suficiente para la translocación del ADN del fago. Se ha demostrado que las proteínas de la membrana celular de huésped específico están implicadas en la prevención de penetración de ADN del fago.

La restricción/modificación es un mecanismo que funciona por la cooperación de dos sistemas enzimáticos, una enzima de restricción de clivaje del ADN y una enzima modificadora del ADN, normalmente una metilasa. El mecanismo funciona por el clivaje del ADN del fago, según entra en la célula.

La infección del fago abortivo se describe como un mecanismo que interfiere con el desarrollo del fago después de que la expresión en el fago haya iniciado. Esto puede eventualmente llevar a un reducido nivel o terminación de la producción de la progenie viable del fago.

No obstante, como muchos otros rasgos de las cepas bacterianas que son importantes para el rendimiento industrial, los mecanismos naturales de defensa del fago anteriormente descritos han demostrado ser características inestables, ya que pueden ser mediadas por plásmidos. Además, estos mecanismos de defensa son frecuentemente específicos del fago, es decir sólo son activos contra una gama limitada de tipos de bacteriófagos. Por consiguiente, la técnica anterior no es consciente de un mecanismo de resistencia asociado a la célula huésped general y establemente mantenido contra la infección por bacteriófagos.

En base de los mecanismos de los mencionados mecanismos de defensa natural, la industria ha diseñado e implementado estrategias para posiblemente reducir la infección por bacteriófagos de cultivos bacterianos incluyendo cultivos iniciadores para la fermentación de productos lácteos. Las estrategias usadas actualmente incluyen el uso de cultivos iniciadores mezclados y el uso alterno de cepas que tienen diferentes perfiles de susceptibilidad al fago (rotación de cepas).

Tradicionalmente, los cultivos iniciadores en la industria láctea son mezclas de cepas bacterianas del ácido láctico. La composición compleja de los cultivos iniciadores mezclados asegura que esté presente un cierto nivel de resistencia al ataque en el fago. No obstante, un repetido subcultivo de cultivos de cepas mezcladas da lugar a cambios imprevisibles en la distribución de cepas individuales y finalmente la indeseada dominación de la cepa. Esto a su vez puede llevar a una aumentada susceptibilidad al ataque en el fago y riesgo de fallos de la fermentación.

La rotación de cepas bacterianas seleccionadas que son sensibles a los diferentes fagos es otro enfoque para limitar el desarrollo del fago. No obstante, es difícil e incómodo identificar y seleccionar un número suficiente de cepas que tienen perfiles de fago de diferentes tipos para proporcionar un programa de rotación eficiente y confiable. Además, el uso continuado de cepas requiere la monitorización cuidadosa por nuevos fagos infecciosos y la necesidad de sustituir rápidamente una cepa que se infecta por el bacteriófago nuevo por una cepa resistente al fago. En plantas de fabricación donde se hacen grandes cantidades de cultivos iniciadores en masa anticipadamente, una respuesta tan rápida normalmente no es posible.

Estudios han demostrado que una capacidad de crecimiento reducida de un cultivo bacteriano tal como una bacteria de ácido láctico deficiente de proteinasa resulta en una proliferación de fago reducida (Richardson *et al.*, 1983, 1984). No obstante, tales cepas bacterianas están creciendo todavía y son así aún susceptibles al ataque por fagos.

Así, la industria no tiene en su posesión ninguna estrategia confiable para garantizar que los cultivos bacterianos usados para fabricación industrial de productos alimenticios u otros productos son resistentes contra ataques por bacteriófagos. Además, ninguna de las estrategias actualmente usadas previenen infecciones por cualquier tipo de bacteriófagos y ninguna de estas estrategias son capaces de impedir que los bacteriófagos, por un evento mutacional, eludan los mecanismos de resistencia de las cepas de cultivo bacteriano.

Es por lo tanto un objetivo importante de la presente invención proporcionar un método de prevenir la infección por bacteriófagos de cultivos bacterianos que se usan en la fabricación de productos alimenticios y otros productos, en donde los cultivos son completamente resistentes al ataque por todo tipo de bacteriófagos.

El artículo (Meagher *et al*, Cell, 1997, Vol. 10, páginas 521-536) describe la expresión de proteínas en minicelulas de *E. coli* por plásmidos recombinantes.

El artículo (Helling *et al*, J. Bacteriol., 1970, vol. 104, n°. 2, páginas 1027-1029) se refiere a los auxótrofos resistentes al ácido nalidíxico de *E. coli*.

El artículo (Worland *et al*, Australian Journal of Plant Physiology, 1999, 26(6), páginas 511-519) describe que los auxótrofos de purina de *Rhizobium*, perturbados en nodulación, tienen múltiples cambios en la síntesis de proteínas.

El artículo (Antón *et al*, J. Bacteriol 77(1): 117-8, 1959) describe una timina “requiriendo” un variante de LAB (bacteria del ácido láctico). No se dice en lugar alguno en este artículo que esta variante no es replicante de ADN. Además, no hay nada descrito sobre la resistencia al fago y uso para hacer un producto alimenticio/pienso.

El artículo (Ross *et al*, Appl Environ Microbiol, 56(7): 2164-9, 1990) se refiere al uso de *thyA* como marcador genético. No hay nada descrito sobre la resistencia al fago y uso para hacer un alimento/producto alimenticio.

El artículo (Pedersen *et al*, Appl Environ Microbiol, 68(6):3010-23, 2002) fue publicado en 2002.

El artículo (Deutch *et al*, J Bacteriol 106:197-203, 1971) describe cosas que pueden pasar durante la incubación de un auxótrofo de timina de *E. Coli*.

El artículo (Breheny *et al*, Aust J Dairy Technol, 30:145-148, 1975) describe las bacterias del ácido láctico (LAB) “bloqueadas en la síntesis de proteínas”. Por consiguiente, en este artículo no están divulgadas LAB que no son replicantes de ADN. Además, no hay nada descrito sobre la resistencia al fago.

El artículo (Desjardins *et al*, J Dairy Sci 73:1478-1484, 1990) describe algunos perfiles de fermentación cinética de una LAB de tipo salvaje natural. Ya que es de tipo salvaje es evidente que el artículo no divulga LAB que no son replicantes de ADN. Además, no hay nada descrito sobre la resistencia de fago.

WO95/10621 (Chr. Hansen) se refiere a los mutantes supresores bacterianos del ácido láctico y su uso como marcadores selectivos.

Resumen de la invención

Por consiguiente, la invención proporciona en un primer aspecto un método para modificar un material de sustrato mediante un cultivo bacteriano que es capaz de ser metabólicamente activo en dicho sustrato, por lo cual el cultivo bacteriano no es susceptible al ataque por bacteriófagos, el método comprendiendo

- (i) aislar una cepa bacteriana que no es capaz de replicación de ADN, transcripción de ARN o síntesis de la proteína en dicho material de sustrato pero es capaz de modificar metabólicamente el material de sustrato,

(ii) propagar la cepa seleccionada en un medio en donde la cepa es capaz de replicarse para obtener un cultivo de dicha cepa,

(iii) añadir el cultivo bacteriano obtenido así al material de sustrato y mantener el material bajo condiciones donde el cultivo es metabólicamente activo,

5

por lo cual, si el material de sustrato se contamina con un bacteriófago, la actividad metabólica del cultivo bacteriano es sustancialmente inafectada por el bacteriófago, y en donde el cultivo bacteriano es seleccionado del grupo que consiste en *Lactococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus, spp.*, *Streptococcus spp.*, *Propionibacterium, spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Corinebacterium spp.* y *Brevibacterium spp.*; y en donde el material de sustrato es un material iniciador para un producto comestible, el material es seleccionado del grupo que consiste en leche, un material vegetal, un producto cárnico, un mosto, un zumo de frutas, un vino, una masa y un rebozado; y en donde el cultivo bacteriano conforme se ha obtenido en el método se usa como un cultivo iniciador en la preparación de un producto seleccionado del grupo que consiste en un aroma lácteo, un producto aromatizante de queso, un producto alimenticio y un producto de pienso.

15

La invención está relacionada en otro aspecto al uso de un cultivo conforme se ha obtenido en el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 como un cultivo iniciador en la preparación de un producto seleccionado del grupo que consiste en un aroma lácteo, un producto aromatizante de queso, un producto alimenticio y un producto de pienso.

20

En un aspecto adicional, está proporcionada una bacteria de ácido láctico mutante, en donde la cepa mutante es la cepa *thyA* mutante de *Lactococcus lactis* MBP71 depositada bajo el número de registro DSM 12891.

25 **Divulgación detallada de la invención**

Así, en su aspecto más amplio la invención proporciona un método para modificar un material de sustrato mediante un cultivo bacteriano que es capaz de ser metabólicamente activo en dicho sustrato, por lo cual el cultivo bacteriano no es susceptible al ataque por bacteriófagos, dicho método que comprende las etapas (i) a (iii) según se ha mencionado anteriormente. Como se utiliza en la presente, la expresión “modificar un material de sustrato” se usa de forma intercambiable con el término “fermentación” y se refiere a cualquier descomposición aeróbica o anaeróbica de compuestos orgánicos por un cultivo bacteriano con la producción de un producto final. Además, se apreciará que la expresión “metabólicamente activo” se refiere a la capacidad del cultivo bacteriano de convertir un material de sustrato tal como p. ej. leche o un azúcar.

35

En el presente contexto, la expresión “no susceptible al ataque por bacteriófagos” incluye la capacidad de una célula huésped de ser metabólicamente activa aunque un bacteriófago se adsorbe a la superficie de la célula huésped e inyecta su ADN en la célula huésped. Como se utiliza en la presente, el término “bacteriófagos” se refiere a cualquier variante de virus que infecta bacterias, incluyendo el grupo de bacteriófagos con cabeza alargada, bacteriófagos con cabeza isométrica y grupo P335 de bacteriófagos.

40

Conforme a la invención, el método comprende en un aspecto el aislamiento de una cepa bacteriana que no es capaz de replicación de ADN, transcripción de ARN o síntesis de proteínas en un material de sustrato específicamente definido, pero es capaz de modificar metabólicamente dicho material. Se entenderá que en este contexto la expresión “un material de sustrato específicamente definido” se refiere a un material de sustrato que es limitado con respecto a al menos un compuesto nutriente que es requerido por la cepa bacteriana para la replicación de ADN, transcripción de ARN o síntesis de proteínas. Evidentemente, fue un hallazgo muy sorprendente que es posible proporcionar tales cepas bacterianas no proliferantes que son incapaces de crecer en materiales de sustrato específicamente definidos, pero que han retenido su capacidad de ser metabólicamente activas. Como se utiliza en la presente, la expresión “cepa bacteriana no proliferante” se refiere a una cepa bacteriana que es incapaz de multiplicarse en un material de sustrato específicamente definido.

50

En una forma de realización particularmente útil de la presente invención, el mencionado material de sustrato específico es limitado con respecto a al menos un compuesto nutriente que es requerido por la cepa bacteriana para la replicación de ADN, transcripción de ARN o síntesis de proteínas. Tales compuestos incluyen aminoácidos o bases nitrogenadas tales como las bases de purina y pirimidina.

55

Así, el crecimiento de la cepa bacteriana es evitado debido a la falta de capacidad de las cepas de sintetizar el compuesto específico con respecto al cual el sustrato es limitado. Tal cepa mutante que ha perdido la capacidad de sintetizar de nuevo tales compuestos esenciales también es referida en la técnica como una “cepa auxotrófica”. Por lo tanto, en formas de realización preferidas, la cepa bacteriana es una cepa mutante que es auxotrófica respecto a un compuesto que no está presente en el material de sustrato y que es requerido por la cepa para la replicación de ADN, transcripción de ARN o síntesis de proteínas.

60

El material de sustrato usado en el método de la invención puede en una forma adicional de realización útil contener al menos un compuesto que inhibe la replicación de ADN, transcripción de ARN o la síntesis de proteínas de la cepa bacteriana. Ejemplos de tales compuestos incluyen cloranfenicol y eritromicina que afectan los ribosomas de la célula bacteriana y así inhiben la síntesis de proteínas.

65

Conforme a la invención, la propagación de la cepa seleccionada antes de su uso en el presente método requiere un medio en donde la cepa es capaz de replicarse para obtener un cultivo de dicha cepa. Se supone que un medio conteniendo el compuesto específico cuyo mutante es incapaz de sintetizar, restaurará la capacidad de crecimiento del mutante, es decir capacidad de replicación de ADN, transcripción de ARN y/o síntesis de proteínas.

En una etapa del método adicional según la invención, el mencionado cultivo bacteriano obtenido se añade al mencionado material de sustrato y se mantiene bajo condiciones donde el cultivo es metabólicamente activo. Se entenderá que en este contexto, el término “condiciones” incluye la temperatura, pH, composición apropiada del material de sustrato o presencia/ausencia de una sustancia inductora, en la que la actividad metabólica del cultivo bacteriano es óptima.

Los bacteriófagos requieren huéspedes con replicación de ADN intacta, transcripción de ARN y síntesis de proteínas a fin de proliferarse. Por consiguiente, los cultivos bacterianos usados en el método de la invención son incapaces de realizar una de las mencionadas actividades, que hacen tales cultivos bacterianos sustancialmente completamente resistentes al ataque por bacteriófagos. Así, la actividad metabólica del cultivo bacteriano está sustancialmente sin afectar aún si el material de sustrato se contamina con bacteriófagos. Como se utiliza en la presente, la expresión “sustancialmente sin afectar” indica que usando métodos de detección convencionales, se no se puede detectar ningún cambio o sólo cambios menores en la actividad metabólica.

Se apreciará que tales bacterias auxotróficas pueden ser proporcionadas sometiendo una cepa bacteriana de tipo salvaje que, bajo condiciones apropiadas, es capaz de crecer en un material de sustrato con o sin un compuesto específico necesario para la replicación de ADN, transcripción de ARN o síntesis de proteínas a un tratamiento de mutagenización y seleccionar una cepa que es sustancialmente incapaz de crecimiento en la ausencia de dicho compuesto específico.

Mutágenos adecuados incluyen mutágenos químicos convencionales y luz UV. Así, como ejemplos, un mutágeno químico puede ser seleccionado de (i) un mutágeno que se asocia con o se incorpora en ADN tal como un análogo de base, p. ej. 2-aminopurina o un agente intercalante tal como ICR-19.1, (ii) un mutágeno que reacciona con el ADN incluyendo agentes alquilantes tales como nitrosoguanidina o hidroxilamina, o metil sulfonato de etano (EMS).

Como alternativa, la bacteria auxotrófica puede ser proporcionada seleccionando mutantes que ocurren espontáneamente que, en comparación con la cepa progenitora, tiene un requisito de crecimiento para un compuesto necesario para la replicación de ADN, transcripción de ARN o síntesis de proteínas.

Se entenderá que también es posible proporcionar un mutante auxotrófico por mutagénesis dirigida, p. ej. usando técnicas de ADN recombinante, tales como técnicas de “knock-out” (bloqueo) de genes, por las cuales el gen específico es desestabilizado y se vuelve no funcional en la bacteria. También es posible construir las cepas bacterianas mutadas según el método de la presente invención por técnicas que implican la pérdida de parte del cromosoma o una base o bases de nucleótidos en la secuencia de ADN que vuelve el gen específico no funcional en la bacteria. Un ejemplo ilustrativo de tal estrategia de eliminación está descrito en detalle en los ejemplos a continuación.

Ejemplos

La mencionada cepa bacteriana progenitora de tipo salvaje se puede seleccionar de cualquier especie bacteriana industrialmente adecuada, es decir la cepa puede ser seleccionada del grupo que consiste en *Lactococcus* spp. incluyendo *L. lactis*, *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Propionibacterium* spp., *Bifidobacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Actinomyces* spp., *Enterobacteriaceae* spp. incluyendo *E. coli*, *Corynebacterium* spp. y *Brevibacterium* spp.

En una forma de realización específica del método según la invención se usa un mutante Pur, incluyendo la cepa de *Lactococcus lactis* DN105 (DSM 12289). Esta cepa bacteriana DN105 acidificante es un mutante auxotrófico de purina capaz de acidificar leche, aunque la cepa no es capaz de crecimiento debido a su requisito de purina, que no está presente en la leche en cantidades suficientes para soportar el crecimiento de tal bacteria. Como se muestra en el ejemplo 1 a continuación, la cepa DN105 es capaz de acidificar leche bajo condiciones de inanición de purina incluso en la presencia de una alta concentración de bacteriófagos.

En una forma útil de realización adicional del método según la invención, se usa un mutante *thyA*, incluyendo la cepa de *Lactococcus lactis* MBP71 (DSM12891). Esta cepa bacteriana MBP71 acidificante, es un mutante auxotrófico de timidina, que es capaz de acidificar la leche, aunque la cepa no es capaz de crecimiento, debido a su requisito de timidina, que no está presente en la leche en cantidades suficientes para soportar el crecimiento de tal mutante. Como se muestra en el ejemplo 2 a continuación, la cepa MBP71 es capaz de acidificar la leche bajo condiciones de inanición de timidina incluso en presencia de una alta concentración de bacteriófagos.

Es conveniente proporcionar las mencionadas cepas bacterianas tanto cuando se usa tanto como una cepa de producción de alimentos o de piensos y como una cepa de producción para metabolitos, como una composición comprendiendo la cepa bacteriana seleccionada para el uso específico. Típicamente, tales composiciones contienen la bacteria en forma concentrada p. ej. a una concentración de células viables (unidades formadoras de colonias, CFUs) que está

ES 2 345 965 T3

en la gama de 10^5 a 10^{13} por g de la composición tal como en la gama de 10^6 a 10^{12} por g. De forma adicional, la composición del cultivo puede contener componentes adicionales tales como nutrientes bacterianos, crioprotectores u otras sustancias que aumentan la viabilidad del ingrediente activo bacteriano durante el almacenamiento. La composición puede p. ej. ser en forma de una composición líquida, congelada o liofilizada.

Como se menciona anteriormente, una característica del cultivo bacteriano según se usa en el método de la invención, es que es capaz de modificar metabólicamente un material de sustrato específicamente definido aunque la cepa es incapaz de crecimiento en tal sustrato. Cuando se usa una bacteria de ácido láctico en el método de la invención, el cultivo bacteriano obtenido tiene típicamente una velocidad de acidificación en la leche que es al menos un 10% de aquella de dicho cultivo cuando está presente en un material de sustrato donde es capaz de replicación de ADN, transcripción de ARN y/o síntesis de proteínas. En formas de realización preferidas, la cepa bacteriana tiene una velocidad de acidificación en la leche que es al menos un 1% incluyendo al menos un 5%, tal como al menos un 10%, p. ej. al menos un 15%, tal como al menos un 20%, incluyendo al menos un 25% de aquella del cultivo cuando está presente en un material de sustrato donde es capaz de replicación de ADN, transcripción de ARN y/o síntesis de proteínas.

Típicamente, la cepa bacteriana usada en el método de la invención se añade al material de sustrato a una concentración en la gama de 10^5 a 10^9 CFU/ml o g del material, tal como al menos 10^5 CFU/ml o g del material, incluyendo al menos 10^6 CFU/ml o g del material, tal como al menos 10^7 CFU/ml o g del material, p. ej. al menos 10^8 CFU/ml o g del material, incluyendo al menos 10^9 CFU/ml o g del material.

Así, la obtención de un cultivo bacteriano que es completamente resistente al ataque por bacteriófagos según el método de la invención, se puede utilizar en todos los contextos industriales donde la proliferación del cultivo en el material de sustrato no es un requisito. Las fermentaciones lácteas de la leche son un ejemplo de un proceso de fabricación industrial, puesto que la proliferación de las bacterias del ácido láctico durante la fermentación de leche no es un requisito, si se obtiene el deseado aroma y acidificación del producto de fermentación. Por lo tanto, en formas de realización útiles, el material de sustrato es un material iniciador para un producto comestible incluyendo leche, un material vegetal, un producto cárnico, un mosto, un zumo de frutas, un vino, una masa y un rebozado.

En formas de realización adicionales, el material de sustrato es un material iniciador para un pienso para animales tal como ensilaje p. ej. hierba, material cereal, guisantes, alfalfa u hoja de remolacha de azúcar, donde los cultivos bacterianos se inoculan en la cosecha del pienso para ser ensilados a fin de obtener una conservación del mismo, o en los productos de desechos animales ricos en proteínas tales como despojos de la matanza y despojos del pescado, también con los objetivos de preservar estos despojos para propósitos de la alimentación animal.

Todavía otra aplicación importante del método según la presente invención es el uso de los cultivos bacterianos denominados probióticos. Por el término "probióticos" se entiende en el presente contexto un cultivo microbiano que, cuando es ingerido en forma de células viables por humanos o animales, confiere un estado de salud mejorado, p. ej. suprimiendo los microorganismos nocivos en el tracto gastrointestinal, reforzando el sistema inmunológico o contribuyendo a la digestión de nutrientes.

Es, como se menciona anteriormente, un objetivo importante de la presente invención proporcionar un método para prevenir la infección por bacteriófagos de cultivos bacterianos que son metabólicamente activos usando células bacterianas no proliferantes. A fin de ser de interés industrial, tal actividad metabólica debería resultar en la producción de una cantidad sustancial del producto final deseado. Así, una posibilidad de aumentar tal producción usando una célula no proliferante es un incremento del flujo a través de las vías metabólicas.

Por consiguiente, en una forma de realización útil, el cultivo bacteriano usado en el método de la invención comprende una cepa genéticamente modificada que, con respecto a su cepa progenitora, es aumenta en al menos una vía metabólica. Tal actividad metabólica incrementada puede p. ej. ser obtenida a través de una vía glicolítica incrementada y/o un flujo incrementado a través de la vía de pentosa fosfato.

Un enfoque para estimular el flujo a través de la vía glicolítica es aumentando la expresión de actividad de la ATPasa, es decir una conversión incrementada de ATP a ADP, según se describe en WO 98/10089. Así, en una forma de realización útil de la invención, la cepa genéticamente modificada tiene, con respecto a su cepa progenitora, una actividad incrementada de la ATPasa.

En una forma de realización interesante de la presente invención, la cepa genéticamente modificada es una en donde el gen que codifica para una ATPasa está bajo el control de un promotor regulable. Como se utiliza en la presente, el término "promotor regulable" se usa para describir una secuencia promotora incluyendo posiblemente secuencias reguladoras para el promotor, cuyo promotor es regulable por uno o más factores presentes en el ambiente de la cepa. Tales factores incluyen el pH del medio de crecimiento, la temperatura de crecimiento, un cambio de temperatura suscitando la expresión de genes de choque térmico, la composición del medio de crecimiento incluyendo el contenido de resistencia iónica/NaCl y la fase de crecimiento/tasa de crecimiento de la bacteria. Tal promotor regulable puede ser el promotor nativo o puede ser un promotor insertado no relacionado naturalmente al gen bien aislado de las mismas especies bacterianas o bien puede ser una secuencia promotora heteróloga, es decir una secuencia derivada de diferentes especies bacterianas.

ES 2 345 965 T3

Las células tales como “células en descanso” o “células no divisibles” representan otros tipos de células no proliferantes que son útiles en el método de la invención y en donde el mencionado incremento del flujo a través de las vías metabólicas es útil. Tales células son incapaces de mitosis o mitosis p. ej. debido a la deficiencia de ADN, ARN y/o proteína necesaria para la separación de la célula. Así, en una forma de realización particularmente útil, el cultivo bacteriano es uno que comprende una cepa bacteriana que es capaz de aumentar el tamaño de las células sin mitosis.

Además, la invención abarca cepas no proliferantes que bajo condiciones específicas son incapaces de crecimiento. Así, en una forma de realización interesante, el cultivo bacteriano comprende una cepa que es un mutante condicional, es decir un mutante que bajo condiciones predeterminadas no realiza al menos una actividad seleccionada del grupo que consiste en replicación de ADN, transcripción de ARN y síntesis de proteínas. Tales condiciones predeterminadas incluyen el pH, temperatura, composición del material de sustrato y presencia/ausencia de sustancias inductoras.

Un medio posible de suministrar tales mutantes condicionales que son fermosensibles es sometiendo una cepa bacteriana que bajo condiciones apropiadas es capaz de crecimiento en un material de sustrato p. ej. a una temperatura por debajo de 30°C a un tratamiento de mutagenización y seleccionando una cepa mutante que es sustancialmente incapaz de crecimiento a temperaturas por debajo de 30°C, pero es capaz del crecimiento a temperaturas más altas.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona una bacteria de ácido láctico modificada que se modifica para hacerse incapaz de realizar la replicación de ADN, transcripción de ARN o síntesis de proteínas en un material de sustrato específicamente definido que es limitado con respecto a al menos un compuesto que es requerido por la cepa bacteriana para la replicación de ADN, transcripción de ARN o síntesis de proteínas, dicha cepa bacteriana modificada es capaz de ser metabólicamente activa en dicho material de sustrato, por lo cual la cepa no es susceptible al ataque por bacteriófagos, sujeto a la limitación de que la bacteria ácida láctica no sea la cepa DN105 (DSM 12289).

En formas de realización útiles, la bacteria ácida láctica según la invención es una cepa mutante siendo auxotrófica con respecto a un compuesto que no está presente en el material de sustrato y que es requerida por la cepa para la replicación.

Las bacterias del ácido láctico actualmente preferidas según la invención son cepas mutantes que son mutantes *thyA* incluyendo la cepa *Lactococcus lactis* MBP71 depositada bajo el número de registro DSM 12891.

La bacteria del ácido láctico modificada según la invención es útil como un cultivo iniciador en la producción de alimentos y de piensos. Por consiguiente, en un aspecto importante adicional la invención se refiere a una composición de cultivo iniciador comprendiendo la bacteria de ácido láctico según la invención.

Como es normal en la producción de procesos de fermentación bacteriana de ácido láctico para aplicar cultivos mezclados a bacterias del ácido láctico, una composición en determinadas formas de realización comprenderá una multiplicidad de cepas bien pertenecientes a las mismas especies o pertenecientes a diferentes especies. Por consiguiente, en un aspecto importante adicional, la invención se refiere a una composición de cultivo iniciador comprendiendo una bacteria de ácido láctico obtenible por el método según la invención en combinación con al menos una bacteria de ácido láctico adicional. Un ejemplo típico de tal combinación útil de bacterias del ácido láctico en una composición de cultivo iniciador es una mezcla de la bacteria obtenible por el método según la invención y uno o más *Lactococcus spp.* tal como *Lactococcus lactis subesp. lactis* o *Lactococcus lactis subesp. lactis* biovar. *diacetylactis* o *Leuconostoc spp.* Tal cultivo mezclado se puede usar en la fabricación de productos lácteos fermentados tal como el suero de leche y el queso.

En una forma de realización, la composición según la invención, es una que de forma adicional comprende al menos un componente que aumenta la viabilidad del ingrediente activo bacteriano durante el almacenamiento incluido un nutriente bacteriano o un crioprotector.

Es también un objetivo de la presente invención proporcionar un método para fabricar un producto alimenticio o de pienso a base del uso de la bacteria modificada de la invención. Así, en su aspecto más amplio, tal método comprende añadir una composición de cultivo iniciador según la invención a un material iniciador de producto alimenticio o pienso y mantener el material iniciador así inoculado bajo condiciones donde la bacteria del ácido láctico es metabólicamente activa. En una forma de realización particularmente útil, el material iniciador del producto alimenticio es leche.

En aspectos adicionales, la invención se refiere al uso de un cultivo como se obtiene en el método según la invención como un cultivo iniciador en la preparación de un producto seleccionado del grupo que consiste en un aroma lácteo, un producto aromatizante de queso, un producto alimenticio y un producto de pienso.

La invención se describirá ahora en detalles adicionales en los siguientes ejemplos no limitativos y los dibujos en donde

Fig. 1. muestra la acidificación de leche desnatada reconstruida (RSM) por la cepa DN105. El pH se siguió durante el tiempo en cultivos de RSM conteniendo la cepa de *Lactococcus lactis* DN105 inoculada a 1%, 10%, 25% y 50% vol/vol;

Fig. 2 ilustra el desarrollo de pH en RSM cuando se inocula con un 25% vol/vol de la cepa de *Lactococcus lactis* CHCC373 o cepa de *Lactococcus lactis* DN105, en presencia de la cepa de bacteriófago 836 a una concentración de al menos 10^8 PFU/ml;

Fig. 3A-3H ilustran el desarrollo de pH en RSM cuando se inocula con un 25% vol/vol de la cepa de *Lactococcus lactis* DN105 con o sin adición del compuesto de purina hipoxantina al medio de cultivo, en presencia de al menos 10^8 Pfu/ml de los siguientes bacteriófagos: CHPC836 (3A); CHPC412 (3B); CHPC783 (3C); CHPC795 (3D); CHPC710 (3E); CHPC12 (3F); CHPC708 (3G); CHPC814 (3H);

Fig. 4. muestra la acidificación de RSM por la cepa de *Lactococcus lactis* MBP71 inoculada a diferentes concentraciones. El pH de cultivos RSM de 200 ml comprendiendo la cepa MBP71 inoculada a un 1%, 5%, 10%, 25%, y 50% (v/v) se monitorizó en línea; y

Fig. 5. muestra la acidificación de RSM, comprendiendo bacteriófagos y/o timidina, por las cepas de *Lactococcus lactis* MBP71 y CHCC373, que se inoculó a una concentración del 25% (v/v) en un volumen de 100 ml de RSM. La concentración de timidina fue de 20 mg/l y el bacteriófago CHPC733 se añadió a una concentración de 2×10^8 Pfu/ml. El pH se monitorizó por la colección de muestras de 2.5 mls.

Ejemplo 1

Uso de una cepa de Lactococcus lactis de purina auxotrófica para obtener resistencia contra los bacteriófagos en fermentaciones de leche

1.1. Materiales y métodos

(i) Cepas bacterianas, medios y condiciones de crecimiento

La cepa de *Lactococcus lactis* DN105 es un mutante auxotrófico de purina (PUR) derivado de la cepa de tipo salvaje CHCC373 descrita en Nilsson y Lauridsen (1992). Una muestra de la cepa de *Lactococcus lactis* DN105 está depositada con Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania el 30 de Junio de 1998 bajo el número de registro DSM 12289.

Se hizo crecer *Lactococcus lactis* en M17 (Terzaghi & Sandine, 1975) en el medio DN químicamente definido (Dickely *et al.*, 1995) o en leche desnatada reconstituida (RSM) conteniendo un 9.5% (p/vol) de polvo de leche desnatada baja en grasa a 30°C. Para la propagación de la cepa DN105, el medio fue suplementado con hipoxantina a una concentración final de 15-50 mg/l. El fenotipo Pur de la cepa DN 105 fue probado por su capacidad de crecer en medio DN con y sin suplemento de hipoxantina.

(ii) Bacteriófagos y su manipulación

Los bacteriófagos fueron purificados por tres fases de aislamiento de placa individuales. Los lisatos de bacteriófagos de alto título fueron preparados por infecciones consecutivas de la cepa huésped CHCC373 con el bacteriófago a una MOI (multiplicidad de infección) de 0.1 a 1.0. Después de la infección el cultivo se hizo crecer a 30°C en M 17 suplementado con 10 mM de CaCl_2 hasta que la lisis fue completada. Los lisatos fueron centrifugados durante 15 min a 6.000 r.p.m. y el sobrenadante estéril filtrado (0.45 μm , Schleicher und Schuell).

(Tabla pasa a página siguiente)

(iii) *Determinación de títulos bacteriófagos*

Para la determinación de títulos de bacteriófagos (unidades de formación de placas por ml) fue usado el método de doble estrato de agar (Adams M.H., 1959; Interscience Publishers, Inc., Nueva York). Los bacteriófagos usados para la prueba de acidificación se catalogan a continuación en la tabla 1:

TABLA 1

Bacteriófagos v títulos de fago

Fago	Título (PFU/ml)
CHPC12	4×10^{10}
CHPC412	3×10^{10}
CHPC708	2×10^{10}
CHPC710	2×10^{10}
CHPC783	1×10^{11}
CHPC795	7×10^{10}
CHPC814	1×10^{10}
CHPC836	4×10^{10}

(iv) *Prueba de la acidificación de RSM por la cepa DN105*

10-400 ml de un cultivo excesivamente crecido de la cepa DN105 en M17 fue cosechado por centrifugación, lavado dos veces con una solución estéril del 0.9% de NaCl para eliminar compuestos residuales de purina y se resuspendió en 10-400 ml de RSM para dar la misma densidad celular como en el cultivo m 17 excesivamente crecido. El material resuspendido fue usado para la inoculación de RSM fresco a concentraciones de volumen/volumen típicamente en la gama del 10 al 100% (v/v). El pH fue monitorizado bien en línea o por medición del pH de muestras de 3 ml recogidas en intervalos.

1.2. *Resultados de la acidificación de RSM por la cepa de Lactococcus lactis DN105*

En general, las células bacterianas de ácido láctico que no tienen replicación intacta de ADN, transcripción de ARN y sistemas de síntesis de proteínas son incapaces de crecer y acidificar la leche. Nilsson y Lauridsen (1992) demostraron que el mutante auxotrófico de purina DN 105 es incapaz de crecer en un medio sin purinas. También se ha informado que los mutantes auxotróficos de purina de *Lactococcus lactis* no crecientes en leche son incapaces de acidificar tal material de sustrato (Dickely *et al.*, 1995). Para probar la capacidad de la cepa DN105 de acidificar un medio con base de leche, la cepa fue inoculada en cantidades variables en RSM como se describe en Materiales y Métodos y el pH del material de sustrato fue monitorizado (Fig. 1).

Los resultados mostrados en la Fig. 1 demuestran claramente que la cepa DN 105 fue capaz de acidificar leche al menos a pH 5.0 incluso bajo condiciones de inanición de purina.

1.3 *Estudios de la resistencia bacteriófaga de la cepa de Lactococcus lactis DN105 en RSM*

Como es conocido generalmente, un bacteriófago requiere una célula huésped susceptible que tiene replicación intacta de ADN, transcripción de ARN y sistemas de síntesis de proteínas para desarrollo. Si un huésped potencial no es capaz de realizar al menos una de estas actividades, los bacteriófagos no se pueden proliferar en la célula.

La Fig. 2 muestra el desarrollo de pH en RSM cuando es inoculado con un 25% vol/vol de la cepa de tipo salvaje CHCC373 o la cepa mutante DN105 en presencia del bacteriófago CHPC836 a una concentración de al menos 10^8 Pfu/ml.

En experimentos adicionales se estudió la resistencia de la cepa DN105 contra varios bacteriófagos en RSM con y sin la adición de hipoxantina. Los bacteriófagos fueron adicionados a RSM a 10^8 a 10^9 bacteriófagos/ml.

La adición de hipoxantina fue usada como un control positivo para la infección de bacteriófagos, ya que la adición de este compuesto de purina habilitó el ataque por bacteriófagos (Fig. 3 A-H). En todos los cultivos sin hipoxantina la cepa añadida DN105 acidificó la leche hasta pH alrededor de 5.0, mientras que con la adición de hipoxantina, ninguno de los cultivos alcanzó un pH por debajo de 5.4.

1.4 Discusión

Este ejemplo muestra que la inanición de una cepa Pur de *L. lactis* para purinas causa la total resistencia a una gama de bacteriófagos y que la cepa Pur de *L. lactis* es capaz de acidificar eficazmente la leche en presencia de un gran número de bacteriófagos para los cuales el correspondiente tipo salvaje es susceptible.

Así, el presente ejemplo muestra que es posible desarrollar cepas que bajo condiciones apropiadas seleccionadas, donde las cepas son incapaces de crecimiento, son completamente resistentes a los bacteriófagos y que tales cepas han retenido la capacidad metabólica para acidificar la leche. Tal sistema de resistencia a los bacteriófagos se puede introducir en el interior de cualquier bacteria p. ej. *Lactococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Enterobacteriaceae spp.* incluyendo *E. coli*, *Corynebacterium spp.* y *Brevibacterium spp.* con respecto a p. ej. la producción de un producto de fermentación bacteriana tal como lactato, diacetilo, acetoina, metanotiol, etanol etc. si la proliferación de las bacterias no es un requisito.

Ejemplo 2

Uso de una cepa de Lactococcus lactis de timidina auxotrófica para obtener resistencia contra los bacteriófagos en fermentaciones de la leche

2.1. Materiales y métodos

(i) Cepas bacterianas, bacteriófagos, medios y condiciones de crecimiento

La cepa de *Lactococcus lactis* MBP71 es un mutante auxotrófico de timidina (*thyA*) derivado de la cepa de tipo salvaje CHCC373 (véase el ejemplo 1). Una muestra de la cepa MBP71 se ha depositado con Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroden Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania el 25 de Junio de 1999 bajo el número de registro DSM12891.

La cepa CHCC373 fue crecida rutinariamente a 30°C en M17 (Terzaghi & Sandine, 1975) suplementada con 0.5% de lactosa, o en leche desnatada reconstituida (RSM) conteniendo un 9.5% (p/v) de polvo de leche desnatada baja en grasa. Para la propagación de la cepa MBP71 los medios fueron suplementados con 20 mg/l de timidina, ya que ni M17 ni RSM soportan el crecimiento del fenotipo de *ThyA*. Durante las manipulaciones para construir la cepa MBP71, 5 mg/l de eritromicina fue añadida a los medios M17 a base de M17 para mantener el plásmido. También, cuando el crecimiento a 37°C fue requerido durante estas manipulaciones los medios a base de M17 fueron suplementados con 50 mM de NaCl para aumentar el crecimiento. DH5 α de *E. coli* (Life Technologies Inc., EEUU) fueron crecidas en medio LB suplementado con 100 mg/l de eritromicina para mantener el plásmido transformado. El bacteriófago CHPC733 fue usado en experimentos de crecimiento donde se probó la resistencia al fago de la cepa MBP71. Para la manipulación del bacteriófago y determinación de títulos véase el ejemplo 1.

(ii) Construcción de plásmido con delección en *thyA* de la cepa CHCC373

Un fragmento de aproximadamente 800 bp aguas arriba de *thyA* de la cepa CHCC373 se obtuvo por PCR en ADN cromosómico usando los cebadores

TATAATCTGCAGGGTCACACTATCAGTAATTG (SEC ID NO:1) y

TATTTTAAGCTTCACAGTCTGCTATTTTGATTC (SEC ID NO:2),

que introducen además un sitio *PstI* y *HindIII*, respectivamente, en los extremos del fragmento. El resultante fragmento incluye la caja -35 del promotor *thyA*, pero no la caja -10. Otro fragmento de aproximadamente 800 bp comprendiendo una parte interna de la región codificante de *thyA* se obtuvo por PCR en ADN cromosómico usando los cebadores

TAAATTAAGCTTCGCAGACAAGATTTTAAAC (SEC ID NO:3) y

ATTTAAGTCGACGGCTCATAGTCCACAAGTTC (SEC ID NO:4),

que introducen un sitio *HindIII* y *SalI*, respectivamente. El resultante fragmento incluye la región codificante íntegra de *ThyA* excepto la primera 8 bp y la última 34 bp. Los dos fragmentos de PCR fueron purificados usando

el kit de purificación QIAquick PCR (QIAGEN GmbH, Alemania), cortados con las enzimas indicadas, y purificados otra vez. El vector pGhost9 (Maguin *et al.*, 1996) fue cortado con las enzimas de restricción *Pst*I y *Sall* y purificado. A partir de entonces, aproximadamente 150 ng del vector y aproximadamente 50 ng de cada uno de los dos fragmentos fueron ligados durante toda la noche a 16°C en un volumen total de 20 µl. De esta mezcla 10 µl fueron usados para transformar DH5α de *E. coli*. ADN del plásmido fue aislado de posibles clones creciendo durante toda la noche en medio LB con 100 mg/l de eritromicina y usando posteriormente 1.5 ml de estos cultivos con el protocolo del kit miniprep spin QIAprep (QIAGEN GmbH, Alemania). El ADN purificado del plásmido fue cortado con *Pst*I y *Sall* y uno de éstos, pMBP63, dio una banda de aprox. 1600 bp. Esta construcción fue verificada de forma adicional por PCR con los cebadores que fueron usados para producir los dos fragmentos, y también con los dos cebadores externos. Finalmente, la construcción fue verificada por la secuenciación de ambas hebras a través de la región de la delección con los dos cebadores

GACTGTTGCCCCATAGCG

(ID de la SEC NO:5) y

GCTTCGATTTTAGTATATGG

(ID de la SEC NO:6).

Todos los cebadores fueron de TAG Copenhagen A/S, Copenhagen, Dinamarca.

(iii) Inactivación del gen cromosómico *thyA* en la cepa CHCC373

Aproximadamente 200 ng de pMBP63 fue usado para transformar la cepa CHCC373. Empleando la característica de sustitución de genes (Biswas *et al.*, 1993) del vector pGhost9, el gen cromosómico *thyA* de la cepa CHCC373 fue a partir de entonces inactivado exitosamente. La resultante cepa, MBP71, demostró ser un mutante auxotrófico de timidina.

(iv) Prueba de la acidificación de RSM por las cepas CHCC373 y MBP71

Cultivos durante toda la noche de M17 con 0.5% de lactosa y 20 mg/l de timidina fueron lavados dos veces en una solución isotónica del mismo volumen que el cultivo durante toda la noche para eliminar la timidina residual. Las células fueron resuspendidas en una solución isotónica fresca de un volumen que fue 1/20 del cultivo durante toda la noche. Estas células resuspendidas fueron usadas para inocular RSM a un determinado volumen identificado por el porcentaje de volumen del cultivo durante toda la noche, es decir una inoculación del 100% (v/v) indica que 5 ml de las células resuspendidas se han usado para inocular 100 ml de RSM. El pH fue monitorizado bien en línea o por medición del pH de muestras de 2.5 ml.

2.2. Resultados de la acidificación de RSM por la cepa de *Lactococcus lactis* MBP71

Para probar la acidificación de RSM por la cepa MBP71 esta cepa fue inoculada en cantidades variables como se describe en Materiales y métodos. El pH del material de sustrato entonces fue monitorizado en línea durante un periodo de 20 horas. Los resultados mostrados en la Fig. 4 demuestran claramente que MBP71 es capaz de acidificar la leche hasta al menos pH 4.5 bajo condiciones de inanición de timidina. Cuando fue añadida timidina al RSM, la cepa MBP71 acidificó el material de sustrato de forma similar a la cepa CHCC373 (detalles no mostrados).

2.3. Estudios de la resistencia al bacteriófago de *Lactococcus lactis* MBP71 en RSM

Como se describe anteriormente, un bacteriófago requiere una célula huésped susceptible, que tiene replicación intacta de ADN, transcripción de ARN y sistemas de síntesis de proteínas, para el desarrollo. Si un huésped potencial no es capaz de realizar sólo una de estas actividades, los bacteriófagos no pueden proliferar en la célula. La cepa auxotrófica de timidina MBP71 es capaz sólo de la replicación de ADN en la presencia de timidina, u otro precursor adecuado para dTTP. Ninguno de estos precursores están presentes en RSM, y la cepa MBP71 no es por lo tanto susceptible al ataque por bacteriófagos bajo estas condiciones.

La Fig. 5 muestra el desarrollo de pH en 100 ml de RSM inoculados con la cepa MBP71 a una concentración del 25% (v/v). Cuando estaba presente la timidina, fue añadida a una concentración final de 20 mg/l. Cuando el bacteriófago CHPC733 estaba presente, fue añadido a una concentración de 2x10⁸ PFU/ml media hora después de la inoculación de la célula. Esto da una MOI (multiplicidad de infección) de 0.2. Los resultados en la Fig. 5 demuestran claramente que la cepa MBP71 acidifica RSM sin timidina hasta al menos pH 4.6 incluso en la presencia de bacteriófagos. No obstante, cuando se añade timidina a RSM la cepa MBP71 se vuelve susceptible al ataque por bacteriófagos y la leche sólo es acidificada hasta pH 5.5, que también está cerca del pH que se alcanza para la cepa de tipo salvaje CHCC373 en presencia de bacteriófagos. Si los bacteriófagos son omitidos, pero se añade timidina, la cepa MBP71 acidifica la RSM de forma similar a la cepa CHCC373 (véase la Fig. 5, detalles no mostrados).

2.4. Discusión

Este ejemplo muestra que la inanición de una cepa *thyA* de *L. lactis* para timidina causa la resistencia total al bacteriófago CHPC733 y que la cepa *ThyA* de *L. lactis* es capaz de acidificar eficazmente la leche bajo estas condiciones. Esto es lo contrario al tipo salvaje, que no es capaz de acidificar la leche a un nivel aceptable bajo las mismas

condiciones. A pesar de que la cepa MBP71 sólo se ha probado por resistencia al bacteriófago para un bacteriófago se cree que la cepa MBP71 es resistente a todos, o la mayoría, de los tipos de bacteriófagos.

Referencias

1. **Biswas, I., A. Gruss, S.D. Ehrlich and E. Maguin.** 1993. High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 175:3628-3635.
2. **Dickely, F., D. Nilsson, E. B. Hansen and E. Johansen.** 1995. Isolation of *Lactococcus lactis* nonsense suppressors and construction of a food-grade cloning vector. *Mol. Microbiol.* 15:839-847.
3. **Maguin, E., H. Prévost, S.D. Ehrlich and A. Gruss.** 1996. Efficient insertional mutagenesis in Lactococci and other gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 178:931-935.
4. **Nilsson, D., and A. A. Lauridsen.** 1992. Isolation of purine auxotrophic mutants of *Lactococcus lactis* and characterisation of the gene hpt encoding hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase. *Mol. Gen. Genet.* 235:359-364.
5. **Richardson, G.H., C.A. Ernstrom, J.M. Kim and C. Daly.** 1983. Proteinase negative variants of *Streptococcus cremoris* for cheese starters. *J. Dairy Sci.* 66:2278-2286.
6. **Richardson, G.H., A.Y. Gamay, M.A. Shelaih, J.M. Kim and C.L. Hansen.** 1984. Paired and single strain protease negative lactic Streptococci for cheese manufacturing. *J. Dairy Sci.* 67:518-521.
7. **Terzaghi, B. E., and W. E. Sandine.** 1975. Improved médium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* 29:807-813.

Referencias citadas en la descripción

- Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector. No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.*

Bibliografía de patentes citada en la descripción

- WO 9510621 A [0025]
- WO 9810089 A [0053]
- US 60091735 B [0091]

Bibliografía distinta de patentes citada en la descripción

- **Meagher et al.** *Cell*, 1997, vol. 10, 521-536 [0016]
- **Helling et al.** *J. Bacteriol.*, 1970, vol. 104 (2), 1027-1029 [0017]
- **Worland et al.** *Australian Journal of Plant Physiology*, 1999, vol. 26 (6), 511-519 [0018]
- **Antón et al.** *J. Bacteriol.*, 1959, vol. 77(1), 117-8 [0019]
- **Ross et al.** *Appl Environ Microbiol*, 1990, vol. 56 (7), 2164-9 [0020]
- **Pedersen et al.** *Appl Environ Microbiol*, 2002, vol. 68 (6), 3010-23 [0021]
- **Deutch et al.** *J Bacteriol*, 1971, vol. 106, 197-203 [0022]
- **Breheny et al.** *Aust J Dairy Technol*, 1975, vol. 30, 145-148 [0023]
- **Desjardins et al.** *J Dairy Sci*, 1990, vol. 73, 1478-1484 [0024]
- **Biswas, I.; A. Gruss; S.D. Ehrlich; E. Maguin.** High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.*, 1993, vol. 175, 3628-3635 [0090]
- **Dickely, F.; D. Nilsson; E. B. Hansen; E. Johansen.** Isolation of *Lactococcus lactis* nonsense suppressors and construction of a food-grade cloning vector. *Mol. Microbiol.*, 1995, vol. 15, 839-847 [0090]

• **Maguin, E.; H. Prévost; S.D. Ehrlich; A. Gruss.** Efficient insertional mutagenesis in Lactococci and other gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.*, 1996, vol. 178, 931-935 [0090]

5 • **Nilsson, D.; A. A. Lauridsen.** Isolation of purine auxotrophic mutants of *Lactococcus lactis* and characterisation of the gene hpt encoding hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase. *Mol. Gen. Genet.*, 1992, vol. 235, 359-364 [0090]

10 • **Richardson, G.H.; C.A. Ernstrom; J.M. Kim; C. Daly.** Proteinase negative variants of *Streptococcus cremoris* for cheese starters. *J. Dairy Sci.*, 1983, vol. 66, 2278-2286 [0090]

• **Richardson, G.H.; A.Y. Gamay; M.A. Shelaih; J.M. Kim; C.L. Hansen.** Paired and single strain protease negative lactic Streptococci for cheese manufacturing. *J. Dairy Sci.*, 1984, vol. 67, 518-521 [0090]

15 • **Terzaghi, B. E.; W. E. Sandine.** Improved médium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.*, 1975, vol. 29, 807-813 [0090].

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Método para modificar un material de sustrato mediante un cultivo bacteriano que es capaz de ser metabólicamente activo en dicho sustrato, por lo cual el cultivo bacteriano no es susceptible al ataque por bacteriófagos, el método comprendiendo

10 (i) aislar una cepa bacteriana que no es capaz de replicación de ADN en dicho material de sustrato pero es capaz de modificar metabólicamente el material de sustrato, en donde la cepa bacteriana es una cepa mutante que es auxotrófica con respecto a un compuesto que no está presente en el material de sustrato y que es requerido por la cepa para la replicación de ADN,

(ii) propagar la cepa seleccionada en un medio en donde la cepa es capaz de replicarse para obtener un cultivo de dicha cepa,

15 (iii) añadir el cultivo bacteriano obtenido al material de sustrato y mantener el material bajo condiciones donde el cultivo es metabólicamente activo,

20 por lo cual, si el material de sustrato está contaminado con un bacteriófago, la actividad metabólica del cultivo bacteriano está sustancialmente sin afectar por el bacteriófago, y en donde el cultivo bacteriano es seleccionado del grupo que consiste en *Lactococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus, spp.* *Streptococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Staphylococcus spp.* *Micrococcus spp.*, *Bacillus, spp.*, *Actinomyces spp.*, *Corynebacterium spp.* y *Brevibacterium spp.*; y en donde el material de sustrato es un material iniciador para un producto comestible, el material es seleccionado del grupo que consiste en leche, un material vegetal, un producto cárnico, un mosto, un zumo de frutas, un vino, una masa y un rebozado; y en donde el cultivo bacteriano conforme es obtenido en el método se usa como un cultivo iniciador en la preparación de un producto seleccionado del grupo que consiste en un aroma lácteo, un producto aromatizante de queso, un producto alimenticio y un producto de pienso.

30 2. Método según la reivindicación 1, en donde la cepa mutante es un mutante Por que incluye la cepa de *Lactococcus lactis* DN105 depositada bajo el número de registro DSM 12289.

3. Método según la reivindicación 1, en donde la cepa mutante es un mutante *thyA* que incluye la cepa de *Lactococcus lactis* MBP71 depositada bajo el número de registro DSM12891.

35 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el cultivo bacteriano es de *Lactococcus lactis*.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la cepa bacteriana es añadida al material de sustrato a una concentración en la gama de 10^5 a 10^9 CFU/mL o g del material.

40 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el cultivo comprende una cepa genéticamente modificada que, con respecto a su cepa progenitora es incrementada en al menos una vía metabólica.

7. Método según la reivindicación 6, en donde la cepa modificada genéticamente tiene, con respecto a su cepa progenitora, una actividad metabólica incrementada seleccionada del grupo que consiste en flujo glicolítico incrementado y flujo incrementado a través de la vía de pentosa fosfato.

45 8. Método según la reivindicación 7, en donde la cepa modificada genéticamente tiene, con respecto a su cepa progenitora, una actividad de ATPasa incrementada.

50 9. Método según la reivindicación 1, en donde el cultivo bacteriano comprende una cepa que es un mutante condicional, que a una condición predeterminada no realiza la replicación de ADN.

10. Método según la reivindicación 9, en donde la predeterminada condición es seleccionada del grupo que consiste en pH, temperatura, composición del material de sustrato y presencia/ausencia de una sustancia inductora.

55 11. Método según la reivindicación 1, en donde el cultivo comprende una cepa bacteriana que es capaz de aumentar el tamaño de las células sin mitosis.

60 12. Uso de un cultivo conforme se obtiene en el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 como un cultivo iniciador en la preparación de un producto seleccionado del grupo que consiste en un aroma lácteo, un producto aromatizante de queso, un producto alimenticio y un producto de pienso.

13. Bacteria de ácido láctico mutante, en donde la cepa mutante es la cepa de *Lactococcus lactis* MBP71 del mutante *thyA* depositada bajo el número de registro DSM12891.

65

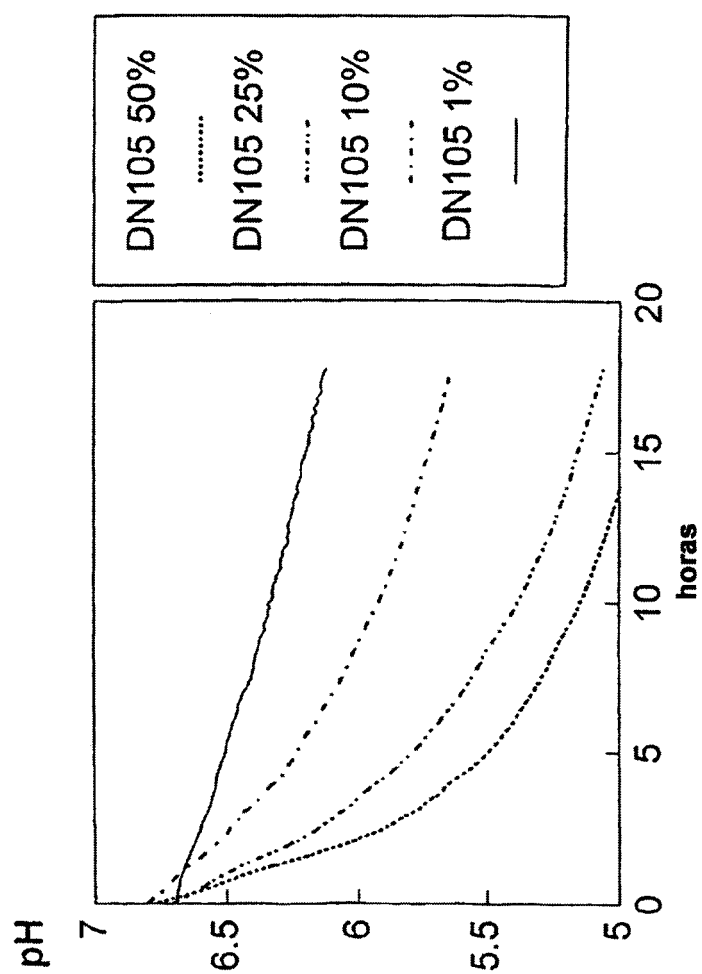


Fig. 1

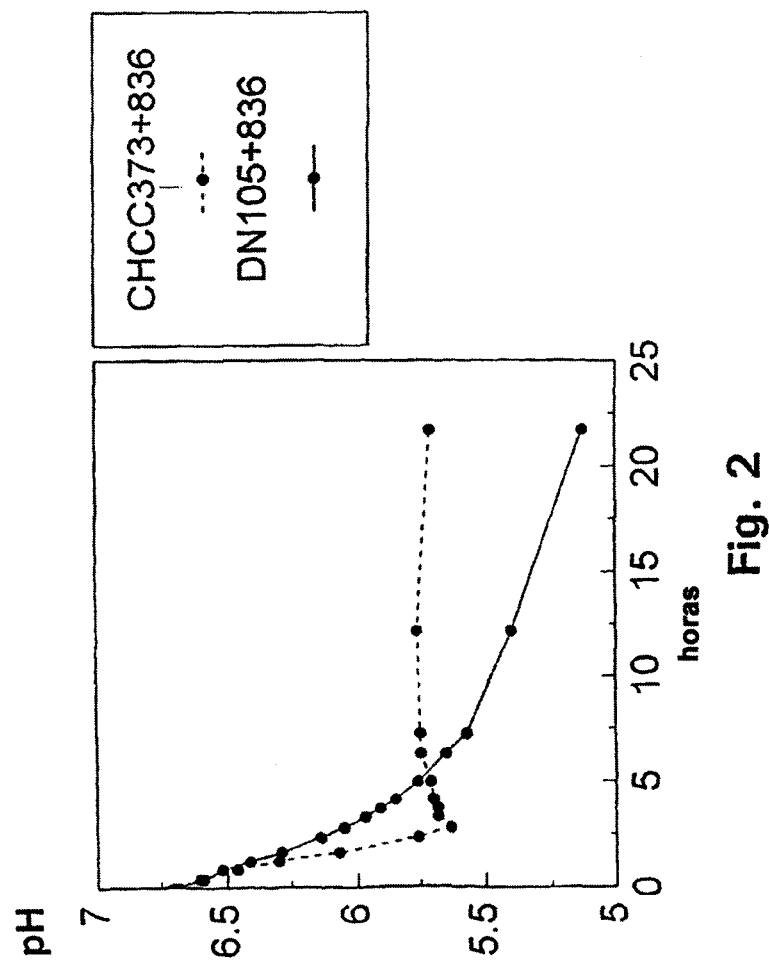


Fig. 2

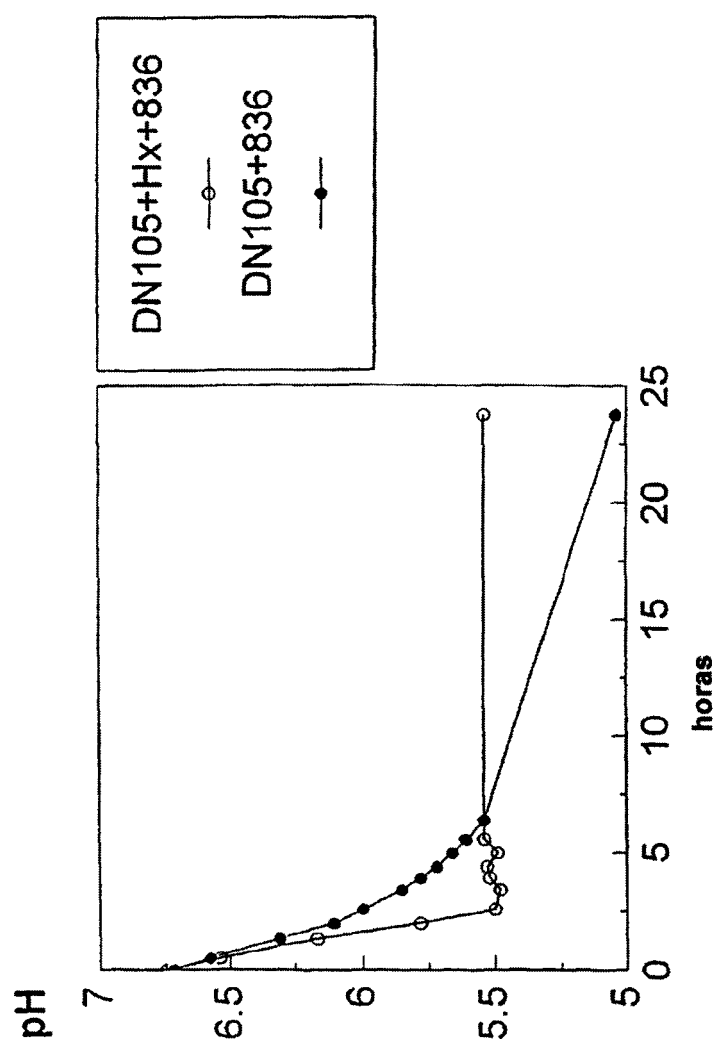


Fig. 3A

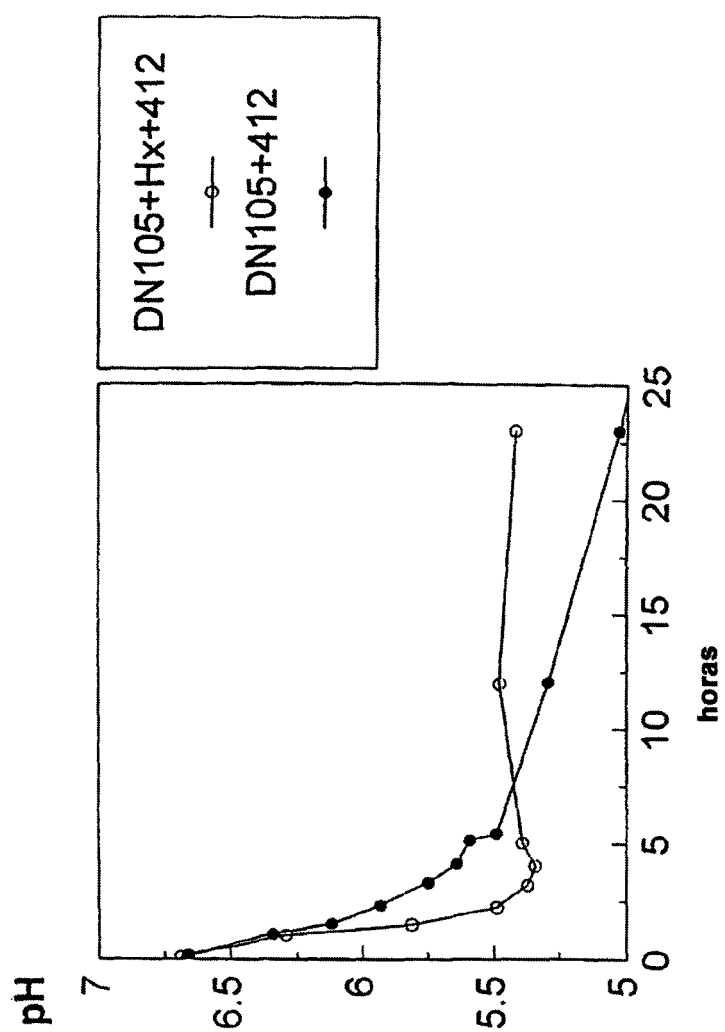


Fig. 3B

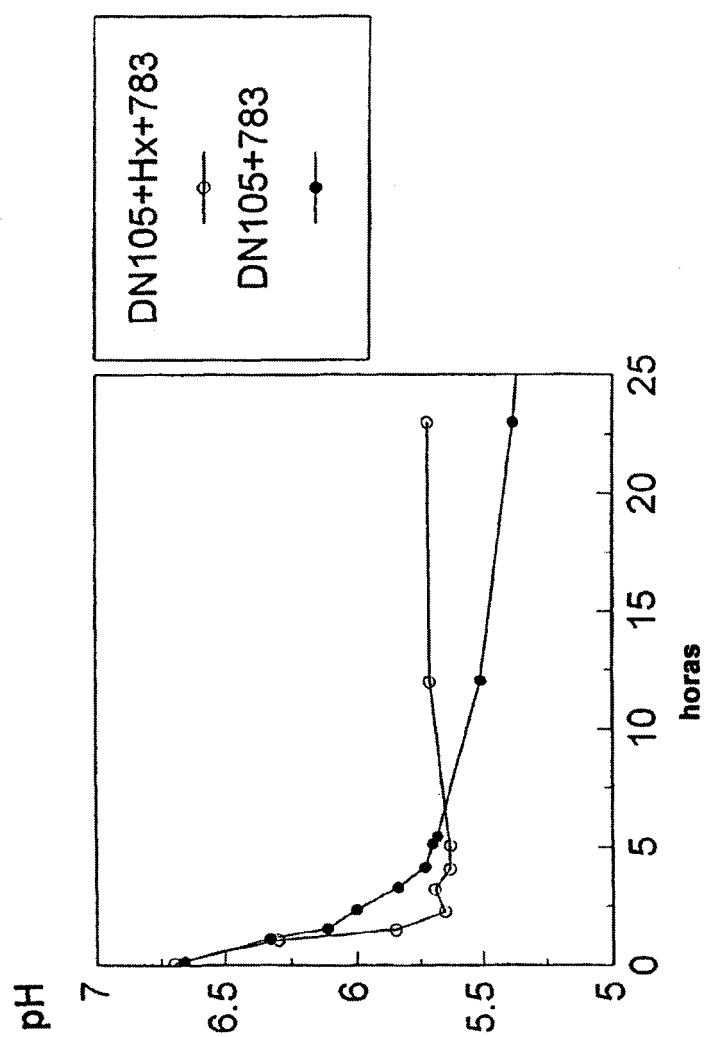


Fig. 3C

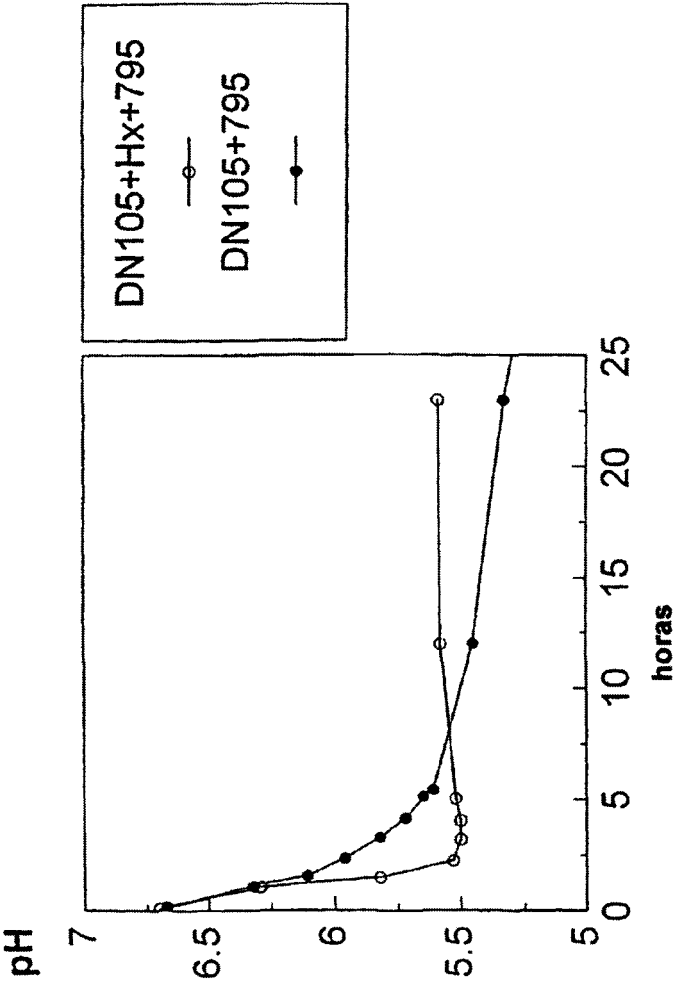


Fig. 3D

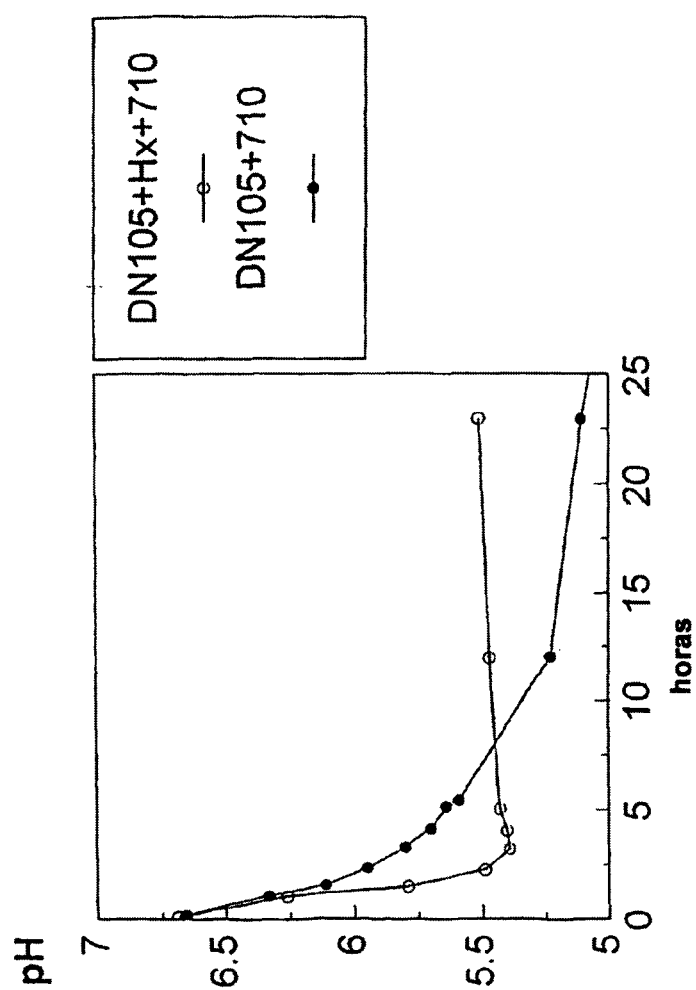


Fig. 3E

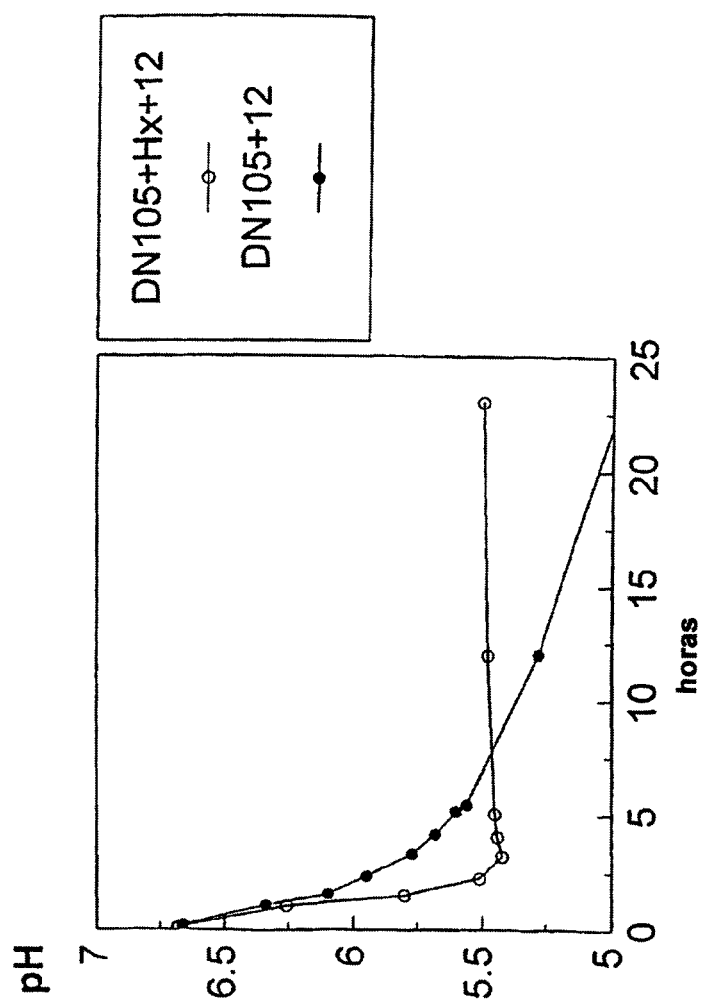


Fig. 3F

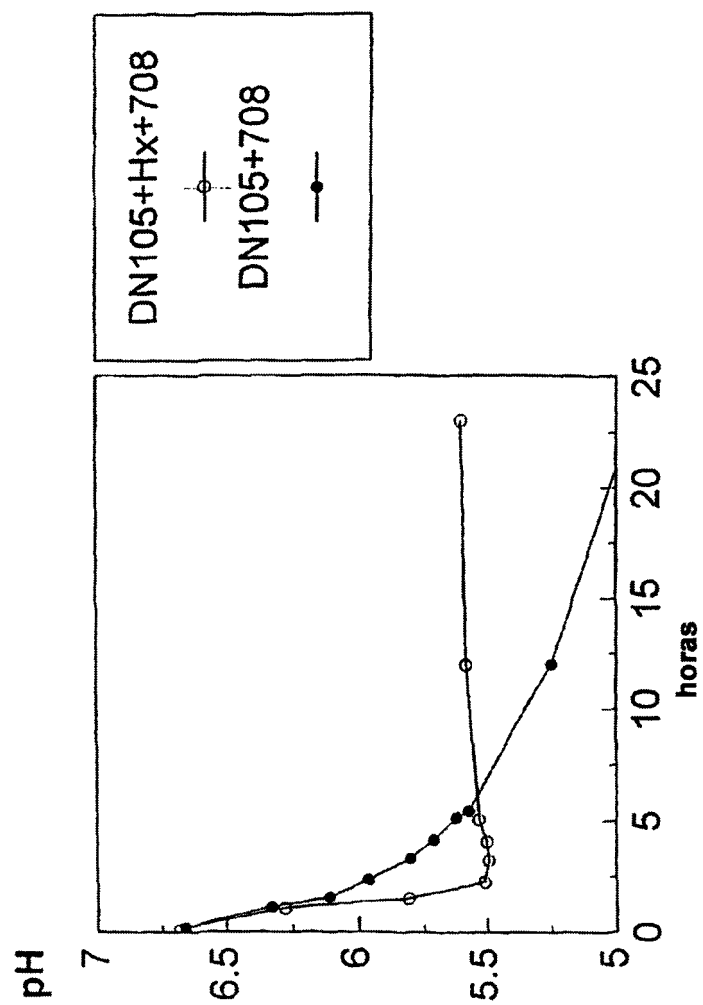


Fig. 3G

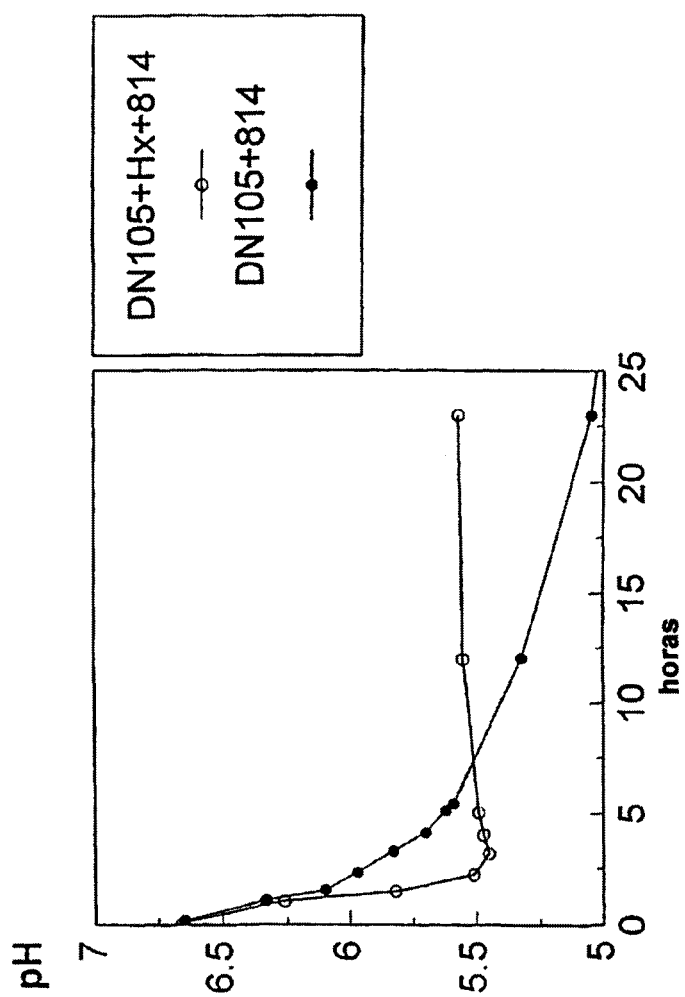


Fig. 3H

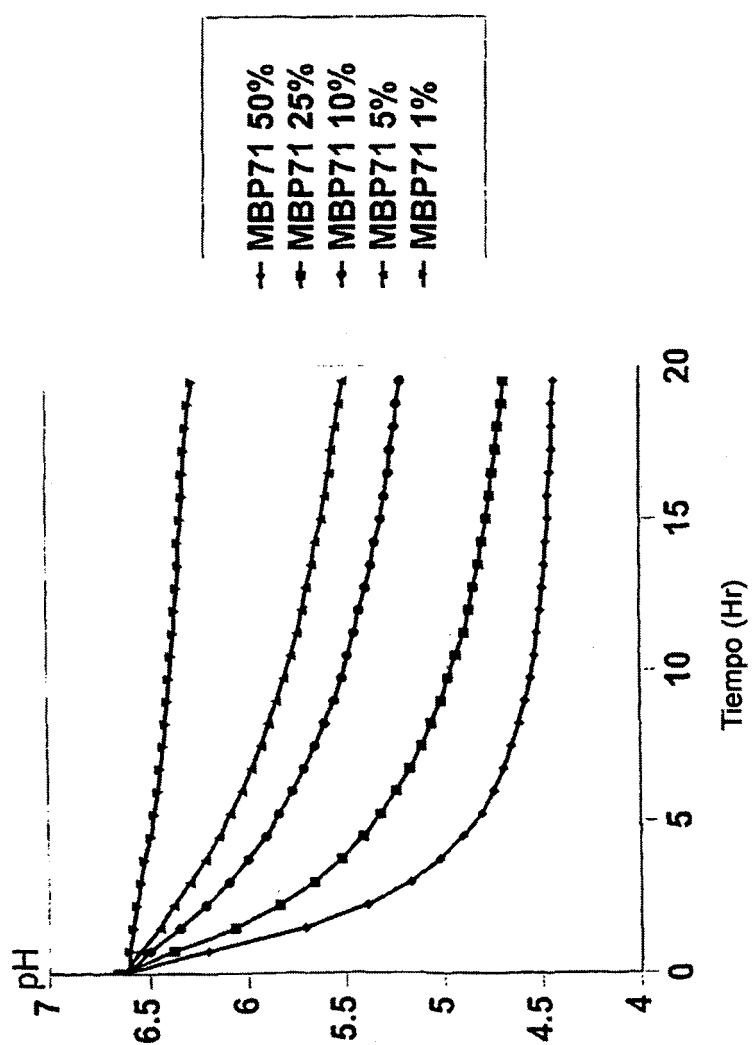
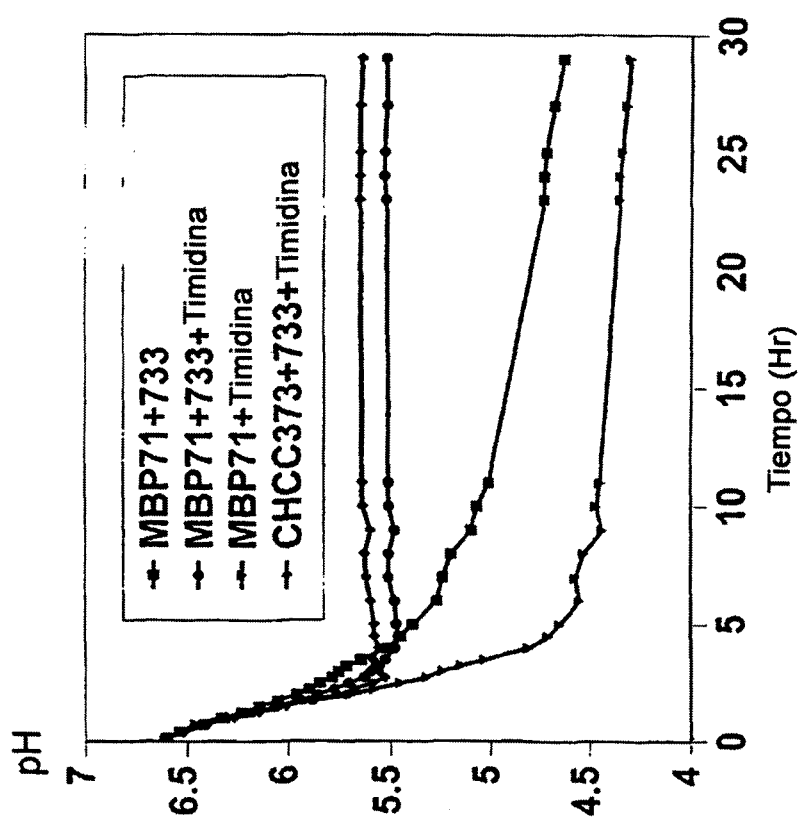


Fig. 4

**Fig. 5**

ES 2 345 965 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Dan Nilsson Thomas Janzen	
5	<120> Método de prevención de infección por bacteriófagos de cultivos bacterianos	
	<130> 21134 PC 1	
	<150> PA 1998 00878	
10	<151> 1998-07-03	
	<150> US 60/091,735	
	<151> 1998-07-06	
	<160> 6	
15	<170> FastSEQ para Windows versión 3.0	
	<210> 1	
	<211> 32	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR para la construcción de plásmidos con delección en <i>thyA</i> de la cepa CHCC373	
25	<400> 1	
	tataatctgc agggtcacac tatcagtaat tg	32
30	<210> 2	
	<211> 33	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR para la construcción de plásmidos con delección en <i>thyA</i> de la cepa CHCC373	
40	<400> 2	
	tattttaagc ttcacagtct gctatttga ttc	33
45	<210> 3	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador de PCR para la construcción de plásmidos con delección en <i>thyA</i> de la cepa CHCC373	
55	<400> 3	
	taaattaagc agatttttaa de ttcgagaca ac	32
60	<210> 4	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Cebador de PCR para la construcción de plásmido con delección en <i>thyA</i> de la cepa CHCC373	

ES 2 345 965 T3

<400> 4	
	atttaagtcg acggctcata gtccacaagt tc 32
5	<210> 5
	<211> 18
	<212> ADN
10	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Cebador de secuenciación usado para la verificación de la construcción de plásmidos con delección en <i>thyA</i> de la cepa CHCC373.
15	<400> 5
	gactgttgcc ccatagcg 18
20	<210> 6
	<211> 20
	<212> ADN
25	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Cebador de secuenciación usado para la verificación de la construcción de plásmidos con delección en <i>thyA</i> de la cepa CHCC373.
30	<400> 6
	gcttcgattt tagtatatgg 20
35	
40	
45	
50	
55	
60	
65	