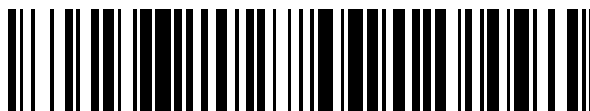


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 811**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

A23C 9/123 (2006.01)

C12R 1/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2007 PCT/IB2007/002639**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.12.2007 WO07144770**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2007 E 07804917 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2034848**

54 Título: **Bacteria Streptococcus thermophilus**

30 Prioridad:

16.06.2006 US 804978 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.05.2017

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)**

**Langebrogade 1
1411 Copenhagen K , DK**

72 Inventor/es:

**FREMAUX, CHRISTOPHE;
HORVATH, PHILIPPE y
SCHWOBE, JOACHIM**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 610 811 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

Bacteria *Streptococcus thermophilus*

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere, entre otras cosas, a una bacteria acidoláctica de acidificación rápida con propiedades texturizantes mejoradas.

10 Antecedentes de la invención

La industria alimentaria utiliza bacterias para mejorar el sabor y la textura de alimentos y también para prolongar la vida útil de estos alimentos. En el caso de la industria láctea, las bacterias lácticas se utilizan habitualmente para, por ejemplo, acidificar la leche (por fermentación) y texturizar el producto en el que se incorporan: entre las bacterias lácticas normalmente utilizadas en la industria alimentaria, como ejemplos se incluyen los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Bifidobacterium*.

Las bacterias acidolácticas de la especie *Streptococcus thermophilus* se utilizan ampliamente en solitario o en combinación con otras bacterias para la producción de productos alimentarios, en particular productos fermentados. En particular se utilizan en la formulación de fermentos utilizados para la producción de leches fermentadas, por ejemplo, yogures. Determinadas bacterias desempeñan una función dominante en el desarrollo de la textura del producto fermentado. Esta característica está estrechamente relacionada con la producción de polisacáridos. Entre las cepas de *Streptococcus thermophilus* es posible diferenciar las cepas que son texturizantes de las que no lo son.

Además, en la industria alimentaria se utilizan ampliamente cultivos - tales como cultivos iniciadores - en la fabricación de productos fermentados incluyendo productos lácteos (tales como yogur, mantequilla y queso), productos cárnicos, productos de panadería, productos vinícolas y vegetales. La preparación de cultivos es laboriosa, ocupa mucho espacio y requiere equipos y entraña un riesgo de contaminación considerable con las bacterias de descomposición y/o fagos durante la etapa de propagación. El fracaso de los cultivos bacterianos por infección y multiplicación de bacteriófagos (fagos) es un problema principal con el uso industrial de los cultivos bacterianos. Hay muchos tipos de fagos diferentes con diversos mecanismos para atacar a las bacterias. Adicionalmente, aparecen nuevas cepas de bacteriófagos.

Como estrategias utilizadas en la industria para minimizar la infección por bacteriófagos, y por tanto minimizar el fracaso de un cultivo bacteriano, se incluyen el uso de: (i) cultivos iniciadores mixtos; y (ii) el uso alternativo de cepas que tienen diferentes perfiles de susceptibilidad a fagos (rotación de cepas).

(i) Tradicionalmente, los cultivos iniciadores en la industria láctea son mezclas de cepas de bacterias acidolácticas. La composición compleja de cultivos iniciadores mixtos garantiza que haya un determinado nivel de resistencia contra el ataque de fagos. Sin embargo, el subcultivo repetido de cultivos de cepas mixtas conduce a cambios impredecibles en la distribución de cepas individuales y eventualmente a dominancia de cepas no deseadas. A su vez esto puede conducir a una susceptibilidad aumentada contra el ataque por fagos y a un riesgo de que se produzcan fracasos durante la fermentación.

(ii) La rotación de cepas bacterianas seleccionadas que son sensibles a diferentes fagos es otra estrategia para limitar el desarrollo de los fagos. Sin embargo, es difícil y engorroso identificar y seleccionar una cantidad suficiente de cepas que tengan perfiles de tipos de fagos diferentes para proporcionar un programa de rotación fiable y eficaz. Además, el uso continuado de cepas requiere una atenta supervisión de nuevos fagos infecciosos y la necesidad de sustituir rápidamente una cepa que esté infectada con el nuevo bacteriófago por una cepa resistente. En las plantas de fabricación, donde se preparan con antelación grandes cantidades de cultivos iniciadores a granel, normalmente dicha respuesta rápida no es posible.

J. R. Broadbent et al. (J. Dairy Sci. 86:407-423, 2003) es una revisión de las aplicaciones bioquímicas, genéticas y de producción de exopolisacáridos en *Streptococcus thermophilus*.

El documento WO9962316A enseña una bacteria acidoláctica que produce exopolisacáridos. La página http://www.bam-rotholz.at/doku-mente/msbkulturen/ep27kulturen_a.pdf supuestamente desvela una especificación del producto de Saurewecker LF7.

M. Viscardi et al. (Journal of Microbial Methods 55, 2003, 109-119) enseñan la selección de mutantes resistentes a bacteriófagos de *Streptococcus thermophilus*.

Existe una continua necesidad en la técnica de proporcionar cepas bacterianas mejoradas para su uso en la industria alimentaria/del pienso animal - tales como cepas bacterianas que tienen propiedades texturizantes mejoradas. Las cepas bacterianas mejoradas que son resistentes a fagos son particularmente deseables.

Sumario de la presente invención

La bacteria acidoláctica de acidificación rápida descrita en el presente documento tiene numerosas ventajas. Como ejemplo, la bacteria acidoláctica de acidificación rápida tiene ventajas en cuanto a la texturización de medios en los que se incorpora. Como ejemplo adicional, esto hace posible obtener geles, por ejemplo, de leches fermentadas, que sean espesas, cohesivas, con película, fibrosas resistentes a la agitación y/o no granulares.

Ventajosamente, la bacteria acidoláctica de acidificación rápida es una bacteria resistente a bacteriófagos por lo cual se minimiza la infección por bacteriófagos y por tanto el fracaso del cultivo bacteriano. Esta es una propiedad importante de la bacteria acidoláctica descrita en el presente documento porque reduce el riesgo de incidentes causados por fagos durante la producción, que puede detener la producción durante un periodo de tiempo para la descontaminación.

Más ventajosamente, la bacteria acidoláctica de acidificación rápida descrita en el presente documento tiene propiedades texturizantes ventajosas y también es resistente a fagos.

Aspectos del sumario de la presente invención

En las reivindicaciones adjuntas se presentan aspectos de la presente invención.

En un primer aspecto, se proporciona una bacteria acidoláctica *Streptococcus thermophilus* de acidificación rápida que genera una viscosidad en la leche fermentada superior a 62 Pascales-segundo (Pa.s) después de 14 días de almacenamiento a 6°C, en el que dicha bacteria comprende la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 19 o un homólogo de la misma con al menos 90 % de identidad con la misma, o un fragmento de SEQ ID N.º 19 que comprende al menos 90 % de la secuencia SEQ ID N.º 19 y en la que dicha bacteria comprende la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 20 o un homólogo de la misma con al menos 99 % de identidad con la misma.

En un aspecto particularmente preferido se proporciona una bacteria acidoláctica de acidificación rápida que genera una viscosidad en leche fermentada superior a aproximadamente 62 Pa.s y cuya bacteria es resistente a fagos.

En un aspecto adicional, se proporciona una cepa de *Streptococcus thermophilus* aislada depositada según el Tratado de Budapest por Danisco Deutschland Niebull GmbH, Buch-Johannsen Strasse.1, Niebull -D-25899, Alemania en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D - 38124 Braunschweig) con el número de depósito 18344 el 14 de junio de 2006. Se confirma por la presente que el depositante ha autorizado al solicitante hacer referencia al material biológico depositado en esta solicitud y que le ha otorgado un consentimiento sin reserva e irrevocable para que el material depositado esté disponible al público.

También se proporciona un cultivo celular que comprende la bacteria acidoláctica o la cepa descrita en el presente documento.

En un aspecto adicional, se proporciona un alimento, un aditivo alimentario, un pienso, un complemento nutricional, o un complemento probiótico que comprende la bacteria acidoláctica, la cepa, o el cultivo celular como se describe en el presente documento.

Un método para preparar un alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional, o complemento probiótico comprende la etapa de añadir la bacteria acidoláctica, la cepa o el cultivo celular, a dicho alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico.

Un aspecto adicional proporciona un alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico obtenido, o que puede obtenerse, mediante uno cualquiera de los métodos que se enseñan en el presente documento, en el que dicho alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico comprende la bacteria acidoláctica, la cepa o el cultivo celular, como se desvela en el presente documento.

También se describe el uso de la bacteria acidoláctica, de la cepa o del cultivo celular para preparar un alimento, un aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico.

En un aspecto adicional, se describe un método para modificar la viscosidad de un alimento, un aditivo alimentario, un pienso, un complemento nutricional o un complemento probiótico que comprende añadir la bacteria acidoláctica, la cepa o el cultivo celular a dicho alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico.

También se describe el uso de la bacteria acidoláctica, de la cepa o del cultivo celular para modificar la viscosidad de un alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico.

En otro aspecto, se describe un método para identificar una bacteria que pertenece al género *Streptococcus thermophilus* que comprende la etapa de explorar la bacteria para determinar la secuencia expuesta en SEQ ID N.º

19 o un homólogo de la misma con al menos 90 % de identidad con la misma, o un fragmento de SEQ ID N.º 19 que comprende al menos 90 % de la secuencia SEQ ID N.º 19, en la que la *Streptococcus thermophilus* es la misma que la cepa *Streptococcus thermophilus* depositada en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D - 38124 Braunschweig) con el número de depósito 18344 el 14 de junio de 2006, o es una *Streptococcus thermophilus* de acidificación rápida que genera una viscosidad en leche fermentada superior a 62 Pascales-segundo (Pa.s) después de 14 días de almacenamiento a 6 °C.

En otro aspecto, se describe un método para identificar una bacteria que pertenece al género *Streptococcus thermophilus* que comprende la etapa de amplificar el locus CRISPR de una bacteria utilizando al menos un cebador oligonucleotídico directo y al menos uno inverso, en el que cada uno de los cebadores flanquea lados opuestos de uno o más espaciadores CRISPR que están ausentes en *Streptococcus thermophilus* DSMZ-18344, en el que la *Streptococcus thermophilus* es la misma que la cepa *Streptococcus thermophilus* depositada en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D - 38124 Braunschweig) con el número de depósito 18344 el 14 de junio de 2006, o es una bacteria acidoláctica *Streptococcus thermophilus* de acidificación rápida que genera una viscosidad en leche fermentada superior a 62 Pascales-segundo (Pa.s) después de 14 días de almacenamiento a 6 °C.

En el presente documento también se enseña una bacteria que pertenece al género *Streptococcus* que se identificó o que puede identificarse mediante el método.

Se describe una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 19 o un homólogo de la misma con al menos 75 % de identidad con la misma.

También se describe una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos, al igual que una construcción o un vector que comprende la secuencia de nucleótidos.

Se describe una célula hospedadora que comprende la construcción o el vector.

También se describe un cebador oligonucleotídico que puede hibridarse con la secuencia de nucleótidos.

Se describe el uso del cebador oligonucleotídico para identificar una bacteria que pertenece al género *Streptococcus*.

También se describe una bacteria acidoláctica, un cultivo aislado, un cultivo celular, un alimento, un aditivo alimentario, un pienso, un complemento nutricional, un complemento probiótico, un método, un uso, una secuencia de ácido nucleico, una construcción, un vector, una célula hospedadora, una secuencia de aminoácidos, o un cebador oligonucleotídico como se ha descrito anteriormente en el presente documento con referencia a la descripción y a las figuras acompañantes.

Otros aspectos de la presente invención se presentan en las reivindicaciones acompañantes y en la siguiente descripción y análisis. Estos aspectos se presentan en los encabezamientos de los distintos apartados. Sin embargo, debe entenderse que las enseñanzas de cada uno de los encabezamientos de los apartados no se limitan necesariamente a ese encabezamiento del apartado particular.

Realizaciones preferidas

Preferentemente, la bacteria es resistente a fagos.

La bacteria es *Streptococcus thermophilus*.

Preferentemente, la *Streptococcus thermophilus* pertenece al grupo genético CL0189.

Preferentemente, la bacteria acidoláctica comprende la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 20.

Preferentemente, el cultivo celular es un cultivo iniciador, un cultivo probiótico o un complemento dietético.

Preferentemente, el cultivo comprende una o más bacterias acidolácticas adicionales seleccionadas de los géneros que consisten en *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Bifidobacterium*.

Preferentemente, el cultivo comprende una o más bacterias acidolácticas adicionales seleccionadas de las especies que consisten en *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y/o *Bifidobacterium*.

Preferentemente, el alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional, o complemento probiótico es un alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional, o complemento probiótico, lácteo, cárnico o basado en cereales.

Preferentemente, el alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional, o complemento probiótico lácteo, es leche, yogur, crema, crema madura, queso, queso fresco, una bebida láctea, un queso procesado, un postre cremoso, requesón o leche infantil.

5 Preferentemente, la leche comprende leche de origen animal y/o vegetal.

Preferentemente, el alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico comprende o consta de un alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico fermentado.

10 Preferentemente, el alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico comprende o consta de un alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico lácteo.

15 Preferentemente, el cebador oligo nucleotídico directo se hibrida con SEQ ID N.º 1 y el cebador oligonucleotídico inverso se hibrida con cualquiera de SEQ ID N.º 2, SEQ ID N.º 3, SEQ ID N.º 4, SEQ ID N.º 5, SEQ ID N.º 6, SEQ ID N.º 7, SEQ ID N.º 8, SEQ ID N.º 9, SEQ ID N.º 10, SEQ ID N.º 11, SEQ ID N.º 12, SEQ ID N.º 13, SEQ ID N.º 14, SEQ ID N.º 15, SEQ ID N.º 16 y/o SEQ ID N.º 17.

20 Preferentemente, el cebador oligonucleotídico directo se hibrida con cualquiera de SEQ ID N.º 2, SEQ ID N.º 3, SEQ ID N.º 4, SEQ ID N.º 5, SEQ ID N.º 6, SEQ ID N.º 7 y/o SEQ ID N.º 8 y un cebador oligonucleotídico inverso se hibrida con cualquiera de SEQ ID N.º 9, SEQ ID N.º 10, SEQ ID N.º 11, SEQ ID N.º 12, SEQ ID N.º 13, SEQ ID N.º 14, SEQ ID N.º 15, SEQ ID N.º 16 y/o SEQ ID N.º 17.

25 Preferentemente, el cebador oligonucleotídico directo se hibrida con cualquiera de SEQ ID N.º 2, SEQ ID N.º 3, SEQ ID N.º 4, SEQ ID N.º 5, SEQ ID N.º 6, SEQ ID N.º 7 y/o SEQ ID N.º 8 y el cebador oligonucleotídico inverso se hibrida con SEQ ID N.º 18.

30 Preferentemente, el cebador oligonucleotídico directo se hibrida con cualquiera de SEQ ID N.º 9, SEQ ID N.º 10, SEQ ID N.º 11, SEQ ID N.º 12, SEQ ID N.º 13, SEQ ID N.º 14, SEQ ID N.º 15, SEQ ID N.º 16 y/o SEQ ID N.º 17 y el cebador oligonucleotídico inverso se hibrida con SEQ ID N.º 18.

Preferentemente, la bacteria que pertenece al género *Streptococcus* es *Streptococcus thermophilus*.

35 Preferentemente, la cepa de *Streptococcus thermophilus* pertenece al grupo genético CL0189.

Preferentemente, la cepa de *Streptococcus thermophilus* tiene sustancialmente las mismas características que las de la cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D - 38124 Braunschweig) con el número de depósito 18344 el 14 de junio de 2006.

40 Preferentemente, la cepa de *Streptococcus thermophilus* es la misma que la cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D - 38124 Braunschweig) con el número de depósito 18344 el 14 de junio de 2006.

45 La expresión "cepa de acidificación rápida", como se utiliza en el presente documento, significa preferentemente una cepa que tiene las siguientes propiedades: una velocidad de acidificación menor de -0,0100 upH/min y un tiempo para alcanzar un pH de 4,6 menor de 540 minutos a 43 °C cuando la tasa de inoculación es entre 1E6 ufc/ml y 1E7 ufc/ml de leche (siguiendo el proceso de leche fermentada descrito más adelante en el apartado titulado "Proceso de Leche Fermentada").

Figuras

55 *Figura 1*
Comparación de los resultados obtenidos utilizando EPSAD PCR-RFLP para *S. thermophilus* CNCM I-2423, *S. thermophilus* CNCM I-2425 y *S. thermophilus* DSMZ-18344.

60 *Figura 2*
Organización de los grupos de genes *eps* de *S. thermophilus*. Todos los operones *eps* conocidos constan de una parte proximal común (genes *epsA*- B-C-D) seguida de una parte altamente variable.

65 *Figura 3*
Representación esquemática de la secuencia de los espaciadores del locus CRISPR 1 de *S. thermophilus* DSMZ-18344, *S. thermophilus* CNCM 1-2425, *S. thermophilus* CNRZ385 y *S. thermophilus* CNCM I-2423. Cada cuadrado representa una secuencia espaciadora.

Descripción detallada de la invención

Bacterias acidolácticas

5 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "bacterias acidolácticas" se refiere a bacterias Gram positivas, microaerófilas o anaerobias que fermentan azúcar con la producción de ácidos, incluyendo el ácido láctico como el ácido predominantemente producido, el ácido acético, el ácido fórmico y el ácido propiónico. Pertenecen al grupo taxonómico de los Firmicutes. Desprovistas de catalasa, las bacterias lácticas constituyen un grupo heterogéneo de bacterias en forma de cocos de los géneros *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*,
10 *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*, o en forma de bastoncillos de los géneros *Lactobacillus* y *Carnobacterium*.

Las bacterias acidolácticas más útiles desde el punto de vista industrial se encuentran entre los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Propionibacterium*. Por
15 tanto, en una realización, se prefiere que la bacteria acidoláctica se seleccione de este grupo de géneros.

En una realización particularmente preferida, la bacteria acidoláctica pertenece al género *Streptococcus*.

Una especie preferida de bacteria láctica es *Streptococcus thermophilus*. Preferentemente, la *Streptococcus thermophilus* que pertenece al grupo genético CL0189.

Streptococcus thermophilus es una especie naturalmente presente en la leche y ampliamente utilizada en la alimentación, y en particular en la industria láctea porque puede utilizarse para acidificar y texturizar productos, tales como la leche. Es una bacteria termófila homofermentativa.

25 Como se describe con más detalle en el presente documento, los cultivos iniciadores de bacterias acidolácticas se utilizan comúnmente en la industria alimentaria como cultivos de cepas mixtas que comprenden una o más especies. Las mezclas de cepas preferidas incluyen mezclas de la bacteria acidoláctica descrita en el presente documento con una o más cepas de *Streptococcus* – tales como diferentes cepas de *Streptococcus thermophilus* – o con una o más cepas que pertenecen a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*,
30 *Pediococcus* y/o *Propionibacterium*.

Se prefieren mezclas de la bacteria acidoláctica descrita en el presente documento con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* y/o *Bifidobacterium*.

35 Se prefieren particularmente mezclas de la bacteria acidoláctica descrita en el presente documento con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Dichos cultivos de cepas mixtas se utilizan típicamente como cultivos iniciadores de yogur donde existe una relación simbiótica entre las especies (Rajagopal et al. J. Dairy Sci., 73, págs. 894-899, 1990).

40 Las bacterias acidolácticas y mezclas de las mismas pueden utilizarse en los cultivos descritos en el presente documento.

Se proporciona una bacteria acidoláctica de acidificación rápida que genera una viscosidad en leche fermentada superior a aproximadamente 62 Pa.s.

Además, un aumento en la tasa de acidificación también reduce el riesgo de fracaso durante la fermentación debido a infección por fagos.

50 Adecuadamente dicha bacteria comprende la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 19 o un homólogo de la misma con al menos 90 % de identidad con la misma.

Adecuadamente, dicha bacteria comprende la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 20 o un homólogo de la misma con al menos 99 % de identidad con la misma.

55 En un aspecto adicional, se proporciona una bacteria acidoláctica que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 19 o un homólogo de la misma con al menos 90 % de identidad con la misma.

60 En un aspecto adicional, se proporciona una bacteria acidoláctica que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 20 o un homólogo de la misma con al menos 99 % de identidad con la misma.

En un aspecto particularmente preferido, la presente invención se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D - 38124 Braunschweig) con el número de depósito 18344 el 14 de junio de 2006.

65 La bacteria acidoláctica puede ser una mutante de la bacteria acidoláctica descrita en el presente documento.

Preferentemente, esta bacteria acidoláctica mutante tiene una o más (preferentemente todas) de las características de la cepa *S. thermophilus* de la presente invención, por ejemplo, la bacteria acidoláctica mutante es una bacteria acidoláctica de acidificación rápida; y/o la bacteria acidoláctica mutante genera una viscosidad en leche fermentada superior a aproximadamente 62 Pa.s, preferentemente aproximadamente 68 Pa.s; y/o la bacteria acidoláctica mutante es resistente a fagos; y/o la bacteria acidoláctica mutante pertenece al grupo genético CL0189; y/o la bacteria acidoláctica mutante comprende la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 20; y/o la bacteria acidoláctica mutante comprende la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 19 u homóloga de la misma con al menos 90 % de identidad con la misma.

10 Actividad acidificante

La actividad acidificante se caracteriza típicamente por tres parámetros: los parámetros cinéticos de acidificación, la acidez que puede titularse y el pH de fermentación final que determina las características organolépticas del producto y su calidad de conservación y la post-acidificación que se desarrolla durante la conservación del producto.

15 Ventajosamente, una tasa de acidificación alta hace posible reducir el periodo durante el cual un producto es sensible a contaminantes (pH > 4,7) y en consecuencia reducir el riesgo de contaminación bacteriana. Un aumento en la tasa de acidificación también potencia los aspectos económicos del proceso aumentando la productividad y la flexibilidad del material industrial.

20 La actividad acidificante de las bacterias acidolácticas puede determinarse utilizando diversos métodos conocidos en la técnica. Como ejemplo, las bacterias acidolácticas pueden crecer inicialmente en caldo y después en leche descremada estéril reconstituida complementada con extracto de levadura y glucosa durante dos subcultivos sucesivos. La leche descremada reconstituida estéril se inocula después con un cultivo activado durante 24 horas y los cambios de pH se determinan utilizando pechímetros durante la incubación.

Ventajosamente, la bacteria acidoláctica de acuerdo con la presente invención es una bacteria de acidificación rápida dado que puede caracterizarse por una rápida acidificación de la leche durante el proceso de fermentación.

30 Preferentemente, la velocidad de acidificación es de aproximadamente -0,013 upH/min a aproximadamente -0,019 upH/min. Más preferentemente, la velocidad de acidificación es de aproximadamente -0,0135 upH/min a aproximadamente -0,018 upH/min. Más preferentemente, la velocidad de acidificación es de aproximadamente -0,014 upH/min a aproximadamente -0,017 upH/min. Más preferentemente, la velocidad de acidificación es de aproximadamente -0,0145 upH/min a aproximadamente -0,017 upH/min. Más preferentemente, la velocidad de acidificación es de aproximadamente -0,015 upH/min a aproximadamente -0,017 upH/min. Más preferentemente, la velocidad de acidificación es de aproximadamente -0,015 upH/min a aproximadamente -0,017 upH/min. Más preferentemente la velocidad de acidificación es de aproximadamente -0,0169 upH/min.

40 Esta tasa de acidificación se compara favorablemente con la de otras cepas de bacterias de acidificación rápida - tales como -0,0129 upH/min, -0,0167 upH/min y -0,0209 upH/min para *S. thermophilus* CNCM I-2423, *S. thermophilus* CNCM 1-2980 y *S. thermophilus* CNCM I-2425, respectivamente.

S. thermophilus CNCM 1-2423 se ha depositado previamente en la CNCM como número de depósito 1-2423 y se describe en el documento WO2004/085607.

45 *S. thermophilus* CNCM 1-2425 se ha depositado previamente en la CNCM como número de depósito 1-2425

S. thermophilus CNCM 1-2980 se ha depositado previamente en la CNCM como número de depósito I-2980 y se describe en el documento WO2004/085607.

50 La bacteria *S. thermophilus* de acidificación rápida es una bacteria que típicamente puede coagular la leche en menos de 540 minutos a 43 °C +/- 1 °C cuando la tasa de inoculación es entre 1E6 ufc/ml y 1 E7 ufc/ml de leche. La velocidad máxima de acidificación es el valor máximo de la curva de pH derivada frente al tiempo. Esta medición final puede obtenerse utilizando la medición de pH *on line* en leche utilizando un dispositivo CINAC (Ysebaert Ltd).

55 En una realización, la tasa de acidificación se mide utilizando métodos que son habitualmente conocidos en la técnica. Típicamente, la tasa de acidificación se medirá supervisando el cambio de pH a lo largo del tiempo.

60 En otra realización, la tasa de acidificación se mide utilizando un dispositivo CINAC que es un aparato que se utiliza mucho en la industria láctea para analizar las propiedades de acidificación de las bacterias acidolácticas.

65 Un sistema automatizado para medir la tasa de acidificación es muy conocido por el experto habitual en la técnica. Pueden encontrarse referencias (por ejemplo) en el documento FR 2 629 612 por ejemplo. El sistema automático CINAC se enseña en el artículo de Corrieu, G. et al Process (ISSN 0998-6650); 1992, No. 1068, págs. 24-27 (10 ref.).

Texturización/viscosidad

5 Como se desvela en el presente documento, se proporciona una bacteria acidoláctica con propiedades o actividades texturizantes mejoradas. En particular, la bacteria acidoláctica presenta la propiedad de conferir viscosidad a un medio de fermentación.

10 La bacteria acidoláctica genera leche fermentada que tiene una viscosidad superior a aproximadamente 62 Pa.s, más preferentemente superior a aproximadamente 65 Pa.s, y más preferentemente superior a aproximadamente 68 Pa.s.

15 Preferentemente, la bacteria acidoláctica genera leche fermentada que tiene una viscosidad en el intervalo de aproximadamente 62 Pa.s a aproximadamente 75 Pa.s, preferentemente de aproximadamente 65 Pa.s a aproximadamente 75 Pa.s, más preferentemente de aproximadamente 62 Pa.s a aproximadamente 68 Pa.s, más preferentemente de aproximadamente 65 a aproximadamente 68 Pa.s, más preferentemente de aproximadamente 68 Pa.s.

Preferentemente, la viscosidad se mide después de 14 días de almacenamiento a aproximadamente 6 °C.

20 Las bacterias acidolácticas descritas en el presente documento son fuertemente texturizantes.

En una realización, la bacteria acidoláctica genera leche fermentada que tiene la viscosidad descrita en el presente documento, medida utilizando uno o más de los métodos descritos a continuación.

25 En la técnica se conoce en diversas mediciones reológicas - tales como el flujo y la viscosidad.

Proceso de leche fermentada

30 En una realización, se producen leches fermentadas recientes a escala de laboratorio. La base láctea se compone de leche UHT comercial complementada con leche en polvo semidesnatada al 3 % (p/p). Después de mezclar, la base láctea se calienta durante 10 minutos +/- 1 minuto a 90 °C +/- 0,2 °C. Después, la base se enfría a 43 °C +/- 1 °C en un baño de agua regulado a 43 °C +/- 1 °C y la leche se despacha en vasos de laboratorio de vidrio de 125 ml. La leche se inocula con la bacteria a una proporción de 1E6-1E7 ufc/ml. La fermentación se realiza a 43 °C +/- 1 °C sin agitación y se detiene cuando el pH alcanza 4,6 +/- 0,05. En ese momento, la leche fermentada reciente se enfría rápidamente a 6 °C +/-1 °C en menos de 1 hora. Finalmente, los productos se almacenan a esta temperatura durante 28 días.

Método para medir la viscosidad:

40 En una realización, las mediciones de viscosidad se realizan a 6 °C en leches fermentadas, después del almacenamiento durante 1, 7, 14 y 28 días a 6 °C. El aparato que se utiliza es un viscosímetro Brookfield® de tipo RVF (Brookfield Engineering Laboratories, Inc.) instalado en un soporte Helipath (Brookfield Engineering Laboratories, Inc.) El viscosímetro está dotado de una aguja de tipo C y la velocidad de oscilación aplicada a la aguja es de 10 rpm. De acuerdo con la presente invención este método es un método preferido para medir la viscosidad.

45 Método para medir el flujo:

50 En otra realización, las mediciones de flujo se realizan a 6 °C en leches fermentadas, después del almacenamiento durante 14 días a 6 °C y habiéndose agitado previamente. El aparato que se utiliza es un reómetro ARI000-N (TA Instruments) dotado de cilindros coaxiales (Radio 1= 15 mm, Radio 2= 13,83 mm, Altura 32 mm, Espacio vacío = 2 mm). Para el segmento ascendiente se aplica una tensión de corte [Pa] en un barrido continuo que varía de 60 a 0 Pa durante un 1 minuto de acuerdo con un módulo lineal. Para el segmento descendiente, la tensión de corte [Pa] se aplica en un barrido continuo que varía de 60 a 0 Pa durante 1 minuto de acuerdo con un modo lineal. Los valores tenidos en cuenta son el área tixotrópica (Pa/s) y el límite elástico (Pa); calculándose este último de acuerdo con el modelo de Casson.

55 De acuerdo con la presente invención, la viscosidad de un alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico, puede modificarse o modularse utilizando la bacteria acidoláctica descrita en el presente documento. Preferentemente, la viscosidad se aumenta.

60 Bacteriófagos

65 Como se usa en el presente documento, el término "bacteriófago" tiene su significado convencional como se entiende en la técnica, es decir, un virus que infecta selectivamente una o más bacterias. Muchos bacteriófagos son específicos de un género o de una especie o de una cepa de bacteria en particular.

El término "bacteriófago" es sinónimo del término "fago".

El bacteriófago puede ser un bacteriófago lítico o un bacteriófago lisogénico.

Un bacteriófago lítico es uno que sigue la ruta lítica a través de la finalización del ciclo lítico, en lugar de entrar en la ruta lisogénica. Un bacteriófago lítico experimenta replicación vírica lo que conduce a la lisis de la membrana celular, a la destrucción de la célula, y a liberación de partículas de bacteriófagos descendientes capaces de infectar a otras células.

Un bacteriófago lisogénico es uno que puede entrar en la ruta lisogénica, en la que el bacteriófago se transforma en una parte pasiva, inactiva, de todo el genoma de la célula antes de finalizar su ciclo lítico.

Los bacteriófagos pueden incluir, pero sin limitación, bacteriófagos que pertenecen a cualquiera de las siguientes familias de virus: *Corticoviridae*, *Cystoviridae*, *Inoviridae*, *Leviviridae*, *Microviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Siphoviridae* o *Tectiviridae*.

Ventajosamente, la bacteria acidoláctica de acuerdo con la presente invención es resistente a fagos.

Durante las 2 últimas décadas se ha recopilado una biblioteca de más de mil fagos virulentos para cepas industriales de *S. thermophilus*. Esta colección de fagos se estudió intensivamente y se estableció su espectro de hospedador. Esto permitió la identificación de un conjunto de 60 fagos representativo de todos los espectros de hospedadores identificados dentro de la colección de fagos. Cada uno de estos fagos representativos se ensayó en las cepas DSMZ18344, CNCM I-2423 y CNCM 1-2425 descritas en el presente documento. Se descubrió que la cepa CNCM 1-2423 era sensible a los fagos D4126 y D3215. Se descubrió que la cepa CNCMI-2425 era sensible al fago D4369. Por el contrario, la cepa DSMZ-18344 de la presente invención era resistente a todos los fagos representativos ensayados.

En una realización, la bacteria acidoláctica de la presente invención es resistente al fago D4126 y/o D3215 y/o al fago D4369.

En una realización, la bacteria acidoláctica de acuerdo con la presente invención es resistente a uno o más bacteriófagos o a uno o más conjuntos de bacteriófagos. En otra realización, la bacteria acidoláctica de acuerdo con la presente invención es resistente al mismo bacteriófago que es resistente a las cepas CNCM 1-2423 y/o CNCM 1-2425.

Locus CRISPR

Como se usa en el presente documento, la expresión "locus CRISPR" se define como el segmento de ADN que incluye todas las repeticiones CRISPR, comenzando con el primer nucleótido de primera repetición CRISPR y finalizando con el último nucleótido de la última (terminal) repetición CRISPR.

El locus CRISPR es una clase distinta de repeticiones de secuencias cortas (SSR, *short sequence repeats*) intercaladas reconocida por primera vez en *E. coli* (Ishino et al. (1987) J. Bacteriol. 169:5429-5433; Nakata et al. (1989) J. Bacteriol. 171:3553-3556). Se han identificado SSR intercaladas similares en *Haloferax mediterranei*, *Streptococcus pyogenes*, *Anabaena* y *Mycobacterium tuberculosis* (Groenen et al. (1993) Mol. Microbiol. 10:1057-1065; Hoe et al. (1999) Emerg. Infect. Dis. 5:254-263; Masepohl et al. (1996) Biochim. Biophys. Acta 1307:26-30; Mojica et al. (1995) Mol. Microbiol. 17:85-93). El loci CRISPR difiere de otras SSR por la estructura de las repeticiones, que se han denominado repeticiones cortas regularmente espaciadas (SRSR, *short regularly spaced repeats*) (Janssen et al. (2002) OMICS J. Integ. Biol. 6:23-33; Mojica et al. (2000) Mol. Microbiol. 36:244-246). Las repeticiones son elementos cortos que se producen en grupos, que siempre están regularmente espaciadas por secuencias intervinientes únicas con una longitud constante (Mojica et al. (2000) Mol. Microbiol. 36:244-246). Aunque las secuencias repetidas están muy conservadas entre las cepas, el número de repeticiones intercaladas y las secuencias de las regiones espaciadoras se diferencian de una cepa a otra (van Embden et al. (2000) J. Bacteriol. 182:2393-2401).

Las características estructurales comunes del locus CRISPR se describen en Jansen et al. (2002) como (i) la presencia de múltiples repeticiones directas cortas, que no muestran o muestran muy poca variación de secuencia en un locus determinado; (ii) la presencia de secuencias espaciadoras no repetitivas entre las repeticiones de tamaño similar; (iii) la presencia de una secuencia líder común de unos pocos cientos de pares de bases en la mayoría de las especies que llevan loci CRISPR múltiples; (iv) la ausencia de fases de lectura abierta largas en el locus; y (v) la presencia de uno o más genes *cas*.

Las repeticiones CRISPR son típicamente secuencias palindrómicas parcialmente cortas de 24-40 pb que contienen repeticiones invertidas internas y terminales de hasta 11 pb. Aunque se han detectado elementos aislados, generalmente se disponen en grupos (de hasta aproximadamente 20 o más por genoma) de unidades repetidas espaciadas por secuencias intervinientes únicas de 20-58 pb. Las repeticiones CRISPR son generalmente homogéneas en un genoma determinado siendo la mayoría de ellas idénticas. Sin embargo, hay ejemplos de repeticiones que son generalmente homogéneas dentro de un genoma determinado. Sin embargo, hay ejemplos de

heterogeneidad, por ejemplo, en las *Archaea* (arqueas) (Mojica *et al.* 2000).
Ventajosamente, el locus CRISPR puede utilizarse para tipificar y/o explorar bacterias.

5 Como apreciará el experto en la materia, hay numerosos métodos diferentes para explorar/tipificar una bacteria. En este aspecto, se exponen numerosos métodos, por ejemplo, en J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. *et al.* (1995 and periodic supplements; *Current Protocols in Molecular Biology*, cap. 9, 13, and 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; y, D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press.

En una realización se utiliza la amplificación.

15 Por "amplificación" se entiende la producción de copias adicionales de una secuencia de ácido nucleico.

Las técnicas de amplificación incluyen, pero sin limitación, métodos generalmente clasificados como métodos de amplificación por ciclado térmico y métodos de amplificación isotérmica

20 Los métodos de ciclado térmicos adecuados incluyen, por ejemplo, la reacción en cadena de la ligasa (*Genomics* 4:560, (1989); y *Science* 241: 1077 (1988)), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (como se describe en los documentos US 4.683.195; US 4.683.202 y US 4.965.188) y la PCR en tiempo real; la reacción en cadena de la ligasa y polimerasa (*PCR Methods and Applic.* (1991) 1:5-16); la LCR con huecos (Gap) (documento WO 90/01069); la reacción de reparación de cadenas (documento EP 439,182); y 3SR (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1989) 86:1173-1177; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1990) 87:1874-1878; y el documento WO 92/0880). Los métodos de amplificación isotérmica incluyen, por ejemplo, amplificación con desplazamiento de cadena (SDA) (*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89:392-396 (1992)), Q-beta-replicasa (*Bio/Technology* 6:1197-1202 (1988)); amplificación de secuencia basada en ácidos nucleicos (NASBA) (*Bio/Technology* 13:563-565 (1995)); y replicación de secuencia autosostenida (*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878 (1990)).

30 En una realización preferida de la presente invención, el método de amplificación es la PCR. Este método se lleva a cabo generalmente utilizando tecnologías de PCR muy conocidas en la técnica (Dieffenbach and Dveksler (1995) *PCR Primer*, a *Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, Plainview, Nueva York).

35 Como se sabe bien en la técnica, para amplificar una secuencia deseada pueden diseñarse cebadores oligonucleotídicos para su uso en las realizaciones de amplificación.

40 Por "cebador" se entienden oligonucleótido, ya sea de origen natural como en una digestión de restricción purificada o ya sea producido sintéticamente, que puede actuar como un punto de inicio de síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico (es decir, en presencia de nucleótidos y de un agente inductor- tal como ADN polimerasa y a una temperatura y a un pH adecuados). Preferentemente el cebador es monocatenario para obtener una eficiencia máxima en la amplificación, pero como alternativa puede ser bicatenario. Si es bicatenario, el cebador se trata primero para separar sus cadenas antes de utilizarse para preparar los productos de extensión. Preferentemente, el
45 cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser lo suficientemente largo como para cebar la síntesis de los productos de extensión en presencia del agente inductor. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluyendo la temperatura, la fuente del cebador y el uso del método. Los cebadores de la PCR tienen preferentemente una longitud de al menos aproximadamente 10 nucleótidos (por ejemplo, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 nucleótidos de longitud), y más preferentemente una longitud de al
50 menos aproximadamente 20 nucleótidos.

En la técnica se conocen generalmente métodos para diseñar cebadores de PCR y clonación de PCR y se desvelan en Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York). Véase también, Innis *et al.*, eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, Nueva York); Innis y Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, Nueva York); e Innis y Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, Nueva York). Los métodos de PCR conocidos incluyen, pero sin limitación, métodos que utilizan cebadores emparejados, cebadores anidados, cebadores específicos sencillos, cebadores degenerados, cebadores específicos de genes, cebadores específicos de vectores, cebadores parcialmente mal emparejados y similares.

60 Adecuadamente, una bacteria puede explorarse amplificando (por ejemplo, amplificando por PC) el locus CRISPR (por ejemplo, CRISPR1) utilizando cebadores que se dirigen a tramos conservados dentro de la secuencia líder y tráiler (como se describe en *et al.*, (2005) *Microbiology* 151 (8):2551-61).

65 Adecuadamente, una bacteria puede explorarse amplificando (por ejemplo, amplificando por PCR) partes seleccionadas del locus CRISPR (por ejemplo, CRISPR1). En este sentido, se ha descubierto sorprendentemente

que la cepa de *Streptococcus thermophilus* descrita en el presente documento carece de 5 espaciadores CRISPR en comparación con, por ejemplo, la cepa CNCM 1-2425 de *S. thermophilus* y la cepa CNRZ385S de *S. thermophilus*. En particular se ha descubierto que la cepa de *Streptococcus thermophilus* de la presente invención carece del primer, segundo, décimo, undécimo y duodécimo espaciador CRISPR1 desde el extremo 5' del espaciador CRISPR en comparación con, por ejemplo, la cepa CNCM 1-2425 de *S. thermophilus* y la cepa CNRZ385 de *S. thermophilus*. Como apreciará el experto en la técnica, esta propiedad de la cepa de *Streptococcus thermophilus* de la presente invención puede utilizarse ventajosamente para detectar esta cepa dado que se obtendrán amplicones de diferente longitud cuando se comparan con al menos la cepa CNCM 1-2425 de *S. thermophilus* y con la cepa CNRZ385 de *S. thermophilus*. Así, por ejemplo, podría diseñarse un primer cebador que se hibridase con la secuencia líder en el extremo 5' del locus CRISPR y podría diseñarse un segundo cebador que se hibridase aguas abajo de la segunda secuencia espaciadora CRISPR ausente y/o aguas abajo del duodécimo espaciador CRISPR ausente en la cepa de *Streptococcus thermophilus* de la presente invención. Como un ejemplo adicional, podría diseñarse un primer cebador que se hibridase aguas abajo de la segunda secuencia espaciadora CRISPR ausente y podría diseñarse un segundo cebador que se hibridase aguas abajo del duodécimo espaciador ausente.

Preferentemente, dicha bacteria se explora utilizando cebadores oligonucleotídicos, que se hibridan específica o sustancialmente con dicha(s) secuencia(s) de nucleótidos como se describe en el presente documento.

En un aspecto, se proporciona un método para identificar una cepa de *Streptococcus thermophilus* que comprende el uso de un cebador oligonucleotídico que se hibrida específicamente con la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 19 o un homólogo de la misma con al menos 75 % de identidad con la misma.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para identificar una cepa de *Streptococcus thermophilus* que comprende el uso de cebadores oligonucleotídicos que flanquean espaciadores CRISPR que están ausentes en la cepa DSMZ-18344 de *Streptococcus thermophilus*.

En una realización, el cebador directo se hibrida con uno o más de los espaciadores CRISPR1 marcados C, D, E, F, G, H o I (véase la Figura 3). El cebador inverso se hibrida con uno o más de los espaciadores CRISPR1 marcados M, N, O, P, Q, o R (véase la Figura 3). Adecuadamente, los cebadores no se hibridan con el espaciador marcado como S. Típicamente, el fragmento amplificado será aproximadamente más corto de 200 pb con DSMZ18344 en comparación con las otras cepas descritas en el presente documento - tal como la cepa CNCM 1-2425.

En un aspecto adicional se proporciona un método para identificar una cepa de *Streptococcus thermophilus* que comprende el uso de un cebador oligonucleotídico directo que se hibrida con SEQ ID N.º 1 y un cebador oligonucleotídico inverso que se hibrida con SEQ ID N.º 18.

En otro aspecto, se proporciona un método para identificar una cepa de *Streptococcus thermophilus* que comprende el uso de un cebador oligonucleotídico directo que se hibrida con SEQ ID N.º 1 y un cebador oligonucleotídico inverso que se hibrida con cualquiera de SEQ ID N.º 2, SEQ ID N.º 3, SEQ ID N.º 4, SEQ ID N.º 5, SEQ ID N.º 6, SEQ ID N.º 7, SEQ ID N.º 8, SEQ ID N.º 9, SEQ ID N.º 10, SEQ ID N.º 11, SEQ ID N.º 12, SEQ ID N.º 13, SEQ ID N.º 14, SEQ ID N.º 15, SEQ ID N.º 16 y/o SEQ ID N.º 17.

En otro aspecto, se proporciona un método para identificar una cepa de *Streptococcus thermophilus* que comprende el uso de un cebador oligonucleotídico directo que se hibrida con cualquiera de SEQ ID N.º 2, SEQ ID N.º 3, SEQ ID N.º 4, SEQ ID N.º 5, SEQ ID N.º 6, SEQ ID N.º 7, SEQ ID N.º 8 y un cebador oligonucleotídico inverso que se hibrida con cualquiera de SEQ ID N.º 9, SEQ ID N.º 10, SEQ ID N.º 11, SEQ ID N.º 12, SEQ ID N.º 13, SEQ ID N.º 14, SEQ ID N.º 15, SEQ ID N.º 16 y/o SEQ ID N.º 17.

En otro aspecto, se proporciona un método para identificar una cepa de *Streptococcus thermophilus* que comprende el uso de un cebador oligonucleotídico directo que se hibrida con cualquiera de SEQ ID N.º 2, SEQ ID N.º 3, SEQ ID N.º 4, SEQ ID N.º 5, SEQ ID N.º 6, SEQ ID N.º 7 y/o SEQ ID N.º 8 y un cebador oligonucleotídico inverso que se hibrida con SEQ ID N.º 18.

En otro aspecto, se proporciona un método para identificar una cepa de *Streptococcus thermophilus* que comprende el uso de un cebador oligonucleotídico directo que se hibrida con cualquiera de SEQ ID N.º 9, SEQ ID N.º 10, SEQ ID N.º 11, SEQ ID N.º 12, SEQ ID N.º 13, SEQ ID N.º 14, SEQ ID N.º 15, SEQ ID N.º 16 y/o SEQ ID N.º 17 y un cebador oligonucleotídico inverso que se hibrida con SEQ ID N.º 18.

Preferentemente, los cebadores oligonucleotídicos directos y/o inversos que se hibridan con SEQ ID N.º 15 y SEQ ID N.º 16 no se utilizan.

El cebador oligonucleotídico inverso puede incluso hibridarse con una secuencia que está aguas arriba de SEQ ID N.º 2.

El cebador inverso puede incluso hibridarse con una secuencia que está aguas abajo de SEQ ID N.º 18.

Después de la amplificación/detección, la secuencia amplificada puede identificarse utilizando diversos métodos conocidos en la técnica.

5 Como ejemplo, la secuencia amplificada puede identificarse determinando el patrón de restricción del producto de amplificación. Por consiguiente, una vez que el ADN se ha amplificado, este puede someterse a digestión (por ejemplo, cortarse) con una o más enzimas de restricción.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión “enzimas de restricción” se refiere a enzimas (por ejemplo, enzimas bacterianas), cada una de ellas cortando ADN bicatenario EN o cerca de una secuencia nucleotídica específica. Las enzimas de restricción son muy conocidas en la materia y pueden obtenerse fácilmente, por ejemplo, a partir de una variedad de fuentes comerciales (por ejemplo, New England Biolabs, Inc., Beverly, Massachusetts). De manera similar, los métodos de uso de las enzimas de restricción también son en general muy conocidos y habituales en la técnica. Pueden utilizarse enzimas de restricción que producen entre 10 y 24 fragmentos de ADN cuando cortan el locus CRISPR o una parte del mismo. Los fragmentos de ADN obtenidos utilizando enzimas de restricción pueden detectarse, por ejemplo, como bandas mediante electroforesis en gel. Las enzimas de restricción pueden utilizarse para crear Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP, *restriction fragment length polymorphisms*).

20 Los RFLP se generan por corte (“restricción”) de una molécula de ADN con una endonucleasa de restricción. Se han aislado varios centenares de dichas enzimas, fabricadas de manera natural por bacterias. En esencia, las bacterias utilizan dichas enzimas como un sistema de defensa, para reconocer y después escindir (restringir) cualquier molécula de ADN extraña que pueda entrar en la célula bacteriana (por ejemplo, una infección vírica). Se ha descubierto que cada uno de los varios centenares de diferentes enzimas de restricción corta (es decir, “escinde” o “restringe”) ADN en una secuencia diferente de los 4 nucleótidos básicos (A, T, G, C) que constituyen todas las moléculas de ADN, por ejemplo, una enzima podría reconocer específica y únicamente la secuencia A-A-T-G-A-C, mientras que otra podría reconocer específica y únicamente la secuencia G-T-A-C-T-A, etc. Dependiendo de la enzima única implicada, la longitud de dichas secuencias de reconocimiento puede variar, desde solo 4 nucleótidos a tanto como 21 nucleótidos. Cuanto mayor sea la secuencia de reconocimiento, menor será el número de fragmentos de restricción, ya que cuanto mayor sea el sitio de reconocimiento, menor será la probabilidad de que se encuentre repetidamente en todo el ADN.

Como ejemplo adicional, la secuencia amplificada puede identificarse determinando o también determinando la diferencia en tamaño del producto de amplificación, como se describe anteriormente.

35 La separación puede realizarse mediante cualquier método adecuado para separar ADN, incluyendo, pero sin limitación, electroforesis en gel, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), espectroscopia de masas, y el uso de un dispositivo microfluídico. En una realización, los productos de amplificación o fragmentos de ADN se separan mediante electroforesis en gel de agarosa. La electroforesis en gel separa moléculas cargadas de diferentes tamaños por su velocidad de desplazamiento a través de un gel estacionario bajo la influencia de una corriente eléctrica. Estos productos de amplificación o fragmentos de ADN separados pueden visualizarse fácilmente, por ejemplo, mediante tinción con bromuro de etidio y observando el gel con luz UV. El patrón de las bandas refleja los tamaños del ADN digerido con enzimas de restricción o los productos de amplificación.

45 Como ejemplo adicional, la secuencia amplificada puede identificarse secuenciando los productos de amplificación.

La secuencia de los productos amplificados puede obtenerse mediante cualquier método conocido en la técnica incluyendo, métodos de secuenciación automáticos y manuales. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York; Roe et al. (1996) *DNA Isolation and Sequencing* (Essential Techniques Series, John Wiley & Sons).

50 Preferentemente, la *Streptococcus thermophilus* que se identificó de acuerdo con los métodos de la presente invención tiene sustancialmente las mismas características que la cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D - 38124 Braunschweig) con el número de depósito 18344 el 14 de junio del 2006. En el contexto de la presente invención, la frase “sustancialmente las mismas características” significa que la cepa de *Streptococcus thermophilus* tiene una o más (preferentemente todas) de las características de la cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D - 38124 Braunschweig) con el número de depósito 18344 el 14 de junio del 2006.

60 Adecuadamente, la *Streptococcus thermophilus* que se identificó es una bacteria acidoláctica de acidificación rápida; y/o el *Streptococcus thermophilus* que se identificó genera una viscosidad en leche fermentada mayor de aproximadamente 62 Pa.s, preferentemente de aproximadamente 68 Pa.s; y/o la *Streptococcus thermophilus* que se identificó es resistente a fagos; y/o la *Streptococcus thermophilus* que se identificó pertenece al grupo genético CL0189; y/o la *Streptococcus thermophilus* que se identificó comprende la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 20; y/o la *Streptococcus thermophilus* que se identificó comprende la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 19 o una variante, un fragmento, un homóloga o un derivado de la misma.

Orientación de CRISPR

Para evitar dudas, en el contexto de la presente invención el locus CRISPR se orientó de la siguiente manera.

5 La secuencia líder CRISPR es un segmento de ADN conservado de tamaño definido. Por ejemplo, la secuencia líder de CRISPR1 de *S. thermophilus* LMG18311 (Acceso CP000024) es el segmento de ADN que comienza inmediatamente después del codón de terminación del gen *stu0660*, y acaba justo antes de la primera repetición. La secuencia líder CRISPR se localiza en el extremo 5' del locus CRISPR. La secuencia líder CRISPR se localiza inmediatamente aguas arriba de la primera repetición CRISPR del locus CRISPR.

10 La secuencia tráiler CRISPR es un segmento de ADN conservado de tamaño definido. Por ejemplo, la secuencia tráiler de CRISPR1 de *S. thermophilus* LMG18311 (Acceso CP000024) es el segmento de ADN que comienza inmediatamente después de la repetición terminal, y acaba justo antes del codón de terminación del gen *stu0661* (localizado en la cadena de ADN opuesta). La secuencia tráiler CRISPR se localiza en el extremo 3' del locus CRISPR. La secuencia tráiler CRISPR se localiza inmediatamente aguas abajo de la repetición terminal.

Como ejemplo, las secuencias líder CRISPR y tráiler CRISPR en el locus CRISPR1 de la cepa CNRZ1066 de *Streptococcus thermophilus* son:

20 *Secuencia Líder CRISPR*
5'-CAAGGACAGTTATTGATTTTATAATCACTATGTGGGTATAAAAACGTCAAATTTTCATTTGAG-3'

Secuencia Tráiler CRISPR
5'-TTGATTCAACATAAAAAGCCAGTTCAATTGAACTTGGCTTT-3'

25 La secuencia líder CRISPR se corresponde con las posiciones 625038 a 625100, y la secuencia tráiler CRISPR se corresponde con las posiciones 627845 a 627885 en el genoma completo (CP000024) de *Streptococcus thermophilus*.

30 Para evitar dudas "aguas arriba" significa en la dirección 5' y "aguas abajo" significa en la dirección 3'.

EPS

35 Se sabe que las bacterias lácticas pueden producir dos clases de polisacáridos en su medio de cultivo, en concreto homopolisacáridos tales como dextranos o levanos, que constan del conjunto repetido de un solo azúcar, y heteropolisacáridos normalmente denominados exopolisacáridos o EPS (EPS es la abreviatura del término "exopolisacárido") que constan del conjunto de diversos azúcares diferentes que forman una unidad de repetición (Cerning J., Bacteries lactiques, [Lactic bacteria], Vol I, by de Roissart H and Luquet F. M., Loriga, 309-329, 1994).

40 Una bacteria láctica que produce un EPS puede otorgar un carácter viscoso y/o una textura suave y cremosa a una leche acidificada (Cerning et al., FEMS Microbiol., 87, 113-130, 1990). Los EPS también pueden presentar actividades biológicas, tales como, por ejemplo, actividades antitumorales o probióticas, que son especialmente ventajosas para la salud humana o animal (Oda M. et al., Agric. Biol. Chem., 47, 1623-1625, 1983; EP94870139.6).

45 En *S. thermophilus* se han caracterizado distintos grupos de genes de EPS. La distribución de genes reguladores y estructurales dentro de cada uno de estos grupos muestra una organización modular que está conservada en otras *Streptococcus* spp. Aunque la función de la mayoría de los genes (normalmente denominados *eps* o *cps*) y de los productos génicos relacionados con los EPS está únicamente deducida a partir de homologías estructurales y secuenciales, la región 5' de cada grupo parece codificar proteínas implicadas en la regulación de la síntesis de EPS, en la determinación de la longitud de la cadena y en la translocación de membrana. Estas fases de lectura abierta van seguidas de genes que codifican la glucosil-1-fosfato transferasa y glucosiltransferasas necesarias para el ensamblaje de la unidad de repetición básica, y enzimas implicadas en la polimerización de unidades de repetición. Finalmente, el extremo 3' de estos grupos contiene típicamente genes para proteínas adicionales implicadas en la translocación de las subunidades poliméricas en la membrana, y enzimas necesarias para la producción de precursores nucleotídicos de azúcar (por ejemplo, N-acetil-D-galactosamina; que son únicos para los EPS (es decir, no encontrados en otros polímeros celulares).

60 Los cuatro primeros genes en la región 5' de los grupos *eps* de *S. thermophilus*, *epsA-D*, que están muy conservados entre estas y otras *Streptococcus* spp EPS⁺, parecen contribuir a las funciones de regulación (*epsA* y *epsB*), polimerización (*epsC*) y translocación de membrana (*epsD*) para la síntesis de EPS. El *epsE* codifica una glucosil-1-fosfato transferasa que cataliza la primera etapa en el ensamblaje de la unidad de repetición básica de EPS: adición de hexosa-1-fosfato al transportador de lípido fosfato. Los genes aguas abajo de *epsE* parecen codificar glucosiltransferasas, funciones de exportación/polimerización, biosíntesis de azúcar, y algunas enzimas cuya función se desconoce. En *S. thermophilus* y en otras bacterias acidolácticas se han identificado genes que codifican una variedad de glucosiltransferasas.

La bacteria acidoláctica de acuerdo con la presente invención comprende un grupo de genes EPS que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 20 o una variante, un fragmento, un homólogo o un derivado de la misma.

- 5 Sorprendentemente la bacteria acidoláctica descrita en el presente documento tiene una similitud de secuencia *eps* alta con *S. thermophilus* CNCM 1-2425 desde el inicio de la secuencia del grupo de genes *eps* hasta aproximadamente la posición 3900 (es decir, en el gen *epsE*) y una similitud de secuencia *eps* alta con *S. thermophilus* CNCM 1-2423 desde aproximadamente la posición 3900 hasta el extremo de la secuencia.

10 HIBRIDACIÓN

La presente invención también incluye secuencias que son complementarias a las secuencias de la presente invención o secuencias que pueden hibridarse bien con las secuencias de la presente invención o con secuencias que son complementarias a las mismas.

- 15 El término "hibridación" como se usa en el presente documento incluirá "el proceso mediante el cual una cadena de ácido nucleico se une con una cadena complementaria mediante emparejamiento de bases" así como el proceso de amplificación realizado con tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

- 20 La presente invención también incluye el uso de secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse con las secuencias que son complementarias a las secuencias en cuestión analizadas en el presente documento, o con cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas.

La presente invención también incluye secuencias que son complementarias a secuencias que pueden hibridarse con las secuencias de nucleótidos analizadas en el presente documento.

- 25 Las condiciones de hibridación se basan en la temperatura de fusión (T_f) del complejo de unión al nucleótido, como enseñan Berger y Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, San Diego CA), y confieren una "rigurosidad" definida como se explica más adelante.

- 30 Típicamente, la rigurosidad máxima se produce a una T_f de aproximadamente 5 °C (5 °C por debajo de la T_f de la sonda); la rigurosidad alta a aproximadamente de 5 °C a 10 °C por debajo de la T_f ; la rigurosidad intermedia a aproximadamente de 10 °C a 20 °C por debajo de la T_f y la rigurosidad baja a aproximadamente de 20 °C a 25 °C por debajo de la T_f . Como entenderán los expertos en la técnica, para identificar o detectar secuencias de nucleótidos idénticas puede utilizarse una hibridación de rigurosidad máxima, mientras que para identificar o detectar secuencias de polinucleótidos similares o relacionadas puede utilizarse una hibridación de rigurosidad intermedia (o baja).

- 40 Preferentemente, la presente invención incluye secuencias que son complementarias a secuencias que pueden hibridarse en condiciones de rigurosidad alta o en condiciones de rigurosidad intermedia con secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que tienen las propiedades específicas como se define en el presente documento.

- 45 Mas preferentemente, la presente invención incluye secuencias que son complementarias a secuencias que pueden hibridarse en condiciones de rigurosidad alta (por ejemplo, 65 °C y 0,1xSSC {1xSSC = NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M pH 7,0}) con secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que tienen las propiedades específicas como se define en el presente documento.

- 50 La presente invención también se refiere a secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse con las secuencias de nucleótidos analizadas en el presente documento (incluyendo las secuencias complementarias de las analizadas en el presente documento).

La presente invención también se refiere a secuencias de nucleótidos que son complementarias a secuencias que pueden hibridarse con las secuencias de nucleótidos analizadas en el presente documento (incluyendo las secuencias complementarias de las analizadas en el presente documento).

- 55 También se incluyen dentro del alcance de la presente invención, secuencias de polinucleótidos que pueden hibridarse con las secuencias de nucleótidos analizadas en el presente documento en condiciones de rigurosidad intermedia a máxima.

- 60 En un aspecto preferido, la presente invención cubre secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse con las secuencias de nucleótidos analizadas en el presente documento, o con el complemento de las mismas, en condiciones rigurosas (por ejemplo, 50 °C y 0,2xSSC).

- 65 En un aspecto más preferido, la presente invención cubre secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse con las secuencias de nucleótidos analizadas en el presente documento, o con el complemento de las mismas, en condiciones de rigurosidad alta (por ejemplo, 65 °C y 0,1xSSC).

SUSTANCIALMENTE

Adecuadamente, los cebadores oligonucleotídicos descritos en el presente documento se emparejan sustancialmente o se hibridan sustancialmente con su ácido nucleico respectivo. Esto significa que un oligonucleótido – tal como un cebador – debe ser suficientemente complementario para hibridarse o emparejarse con su ácido nucleico respectivo.

La secuencia oligonucleotídica no debe reflejar necesariamente la secuencia exacta de su ácido nucleico respectivo, y puede, de hecho, estar “degenerada”. Las bases u otras secuencias no complementarias pueden intercalarse en el oligonucleótido o ácido nucleico, siempre que la secuencia oligonucleotídica tenga suficiente complementariedad con la secuencia para permitir la hibridación. Por tanto, como ejemplo, pueden seleccionarse cebadores que se utilizan para la amplificación por PCR para que sean “sustancialmente” complementarios a la secuencia específica que va a amplificarse.

15 CULTIVOS INICIADORES

Los cultivos iniciadores se utilizan ampliamente en la industria alimentaria en la fabricación de productos (por ejemplo, productos fermentados) incluyendo productos lácteos – tales como yogur y queso.

Los cultivos iniciadores que se utilizan en la fabricación de muchas leches fermentadas, queso y productos de mantequilla incluyen cultivos de bacterias, generalmente clasificados como bacterias acidolácticas. Dichos cultivos iniciadores bacterianos confieren características específicas a diversos productos lácteos realizando diversas funciones.

Los cultivos de bacterias no concentrados comerciales se denominan en la industria ‘cultivos madre’ y se propagan en el sitio de producción, por ejemplo, un lácteo, antes de añadirse a un material de partida comestible, tal como leche, para la fermentación. El cultivo iniciador propagado en el sitio de producción para la inoculación en un material de partida comestible se denomina “iniciador a granel”.

El cultivo iniciador bacteriano puede consistir en la bacteria acidoláctica descrita en el presente documento, es decir, un cultivo puro. En este caso, sustancialmente, toda, o al menos una parte significativa del cultivo iniciador bacteriano comprenderá generalmente la misma bacteria.

En la alternativa, el cultivo iniciador puede comprender diversas cepas bacterianas, es decir, puede ser un cultivo mixto definido.

Por ejemplo, el cultivo iniciador puede ser adecuado para su uso en la industria láctea. Cuando el cultivo iniciador se utiliza en la industria láctea, éste puede comprender adicionalmente especies de bacterias acidolácticas, una especie de *Bifidobacterium*, una especie de *Brevibacterium* y/o una especie de *Propionibacterium*.

Los cultivos de bacterias acidolácticas se utilizan habitualmente en la fabricación de productos lácteos fermentados – tales como suero de mantequilla, yogur o nata agria de soja, y en la fabricación de mantequilla y queso, por ejemplo, Brie o Harvati.

Las bacterias acidolácticas adecuadas incluyen cepas habitualmente utilizadas de una especie de *Lactococcus*, de una especie de *Streptococcus*, de una especie de *Lactobacillus*, incluyendo *Lactobacillus acidophilus*, especies de *Enterococcus*, especies de *Pediococcus*, especies de *Leuconostoc* y especies de *Oenococcus* o combinaciones de las mismas.

Las especies de *Lactococcus* incluyen la ampliamente utilizada *Lactococcus lactis*, incluyendo *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

Otras especies de bacterias acidolácticas incluyen *Leuconostoc* sp., *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus helveticus*. Los cultivos mesófilos de bacterias acidolácticas se utilizan habitualmente en la fabricación de productos lácteos fermentados, tales como suero de mantequilla, yogur o nata agria, y en la fabricación de mantequilla y queso, por ejemplo, Brie o Harvati. Además, pueden añadirse cepas probióticas tales como *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* durante dicha fabricación para potenciar el sabor o favorecer la salud.

Como cultivos de bacterias acidolácticas habitualmente utilizados en la fabricación de quesos cheddar y Monterey Jack se incluyen, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* o sus combinaciones.

Como cultivos termófilos de bacterias acidolácticas habitualmente utilizados en la fabricación de quesos italianos tales como pasta hilada o parmesano, se incluyen *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Otras especies de *Lactobacillus* – tales como *Lactobacillus helveticus* – pueden añadirse durante la

fabricación para obtener un sabor deseado.

5 La selección de organismos para el cultivo iniciador de la invención dependerá del tipo de producto particular que se vaya a preparar y a tratar. Por tanto, por ejemplo, para la fabricación de queso y mantequilla, en general se utilizan cultivos mesófilos de especies de *Lactococcus*, especies de *Leuconostoc* y especies de *Lactobacillus*, mientras que para el yogur y otros productos lácteos fermentados, se utilizan típicamente cepas termófilas de especies de *Streptococcus* y de *Lactobacillus*.

10 El cultivo iniciador puede ser incluso un cultivo iniciador deshidratado.

El cultivo iniciador puede ser un cultivo iniciador concentrado.

El cultivo iniciador puede ser un cultivo iniciador concentrado que se utiliza en la inoculación directa.

15 El cultivo iniciador puede ser un cultivo iniciador congelado.

PREPARACIÓN DE CULTIVOS INICIADORES

20 Los cultivos iniciadores pueden prepararse mediante técnicas bien conocidas en la materia, tales como las desveladas en el documento US 4.621.058. Como ejemplo, los cultivos iniciadores pueden prepararse introduciendo un inóculo, por ejemplo, una bacteria, en un medio de cultivo para producir un medio inoculado y la maduración del medio inoculado para producir un cultivo iniciador.

25 Preparación de cultivos iniciadores deshidratados

Los cultivos iniciadores deshidratados pueden prepararse mediante técnicas bien conocidas en la materia, tales como las desveladas en los documentos US 4.423.079 y US 4.140.800.

30 Los cultivos iniciadores deshidratados para su uso en la presente invención pueden estar en forma de preparaciones sólidas. Como ejemplos de preparaciones sólidas se incluyen, pero sin limitación, comprimidos, bolitas, cápsulas, espolvoreos, gránulos y polvos que pueden humedecerse, secarse por pulverización, secarse por congelación o liofilizarse.

35 Los cultivos iniciadores deshidratados para su uso en la presente invención pueden estar en forma de bolita congelada o en forma de polvo criodesecado. Los cultivos iniciadores deshidratados en forma de bolita congelada o polvo criodesecado pueden prepararse de acuerdo con los métodos conocidos en la materia.

40 Los cultivos iniciadores para su uso en la presente invención pueden estar en forma de concentrados que comprenden una concentración sustancialmente alta de una o más bacterias. Preferentemente, los concentrados pueden diluirse con agua o resuspenderse en agua o en otros diluyentes adecuados, por ejemplo, un medio de cultivo apropiado o aceites minerales o vegetales para su uso en la presente invención. Los cultivos iniciadores deshidratados de la presente invención en forma de concentrados pueden prepararse de acuerdo con los métodos conocidos en la materia, por ejemplo, por centrifugación, filtración o una combinación de dichas técnicas.

45 PRODUCTO

De acuerdo con la presente invención se contempla cualquier producto, que se prepare a partir de, que contenga o que comprenda, una bacteria acidoláctica.

50 Los productos adecuados incluyen, pero sin limitación, un alimento, un producto alimentario, un aditivo alimentario, un complemento alimentario, un pienso, un complemento nutricional, un complemento probiótico, un producto cosmético o un producto farmacéutico.

55 Estos incluyen, pero sin limitación, frutas, legumbres, cultivos forrajeros y verduras incluyendo productos derivados, grano y productos derivados de grano, alimentos lácteos y productos derivados de alimentos lácteos, carne, aves de corral y marisco.

60 El término "alimento" se utiliza en un sentido amplio e incluye piensos, productos alimentarios, ingredientes alimentarios, complementos alimentarios y alimentos funcionales. En el presente documento, el término "alimento" se utiliza en un sentido amplio - e incluye alimento para seres humanos, así como alimento para animales (es decir, un pienso). En un aspecto preferido, el alimento es para consumo humano.

65 Como se usa en el presente documento, la expresión "ingrediente alimentario" incluye una formulación, que se añade o que puede añadirse a los alimentos e incluye formaciones que pueden utilizarse a bajos niveles en una amplia variedad de productos que requiere, por ejemplo, la acidificación o emulsificación.

Como se usa en el presente documento, la expresión “alimento funcional” significa un alimento que puede proporcionar no solo un efecto nutricional y/o un sabor agradable, sino que también puede proporcionar un efecto beneficioso adicional al consumidor. Aunque no hay una definición legal de un alimento funcional, la mayor parte de las personas con un interés en este campo están de acuerdo en que hay alimentos comerciales que tienen efectos específicos para la salud.

Las bacterias descritas en el presente documento pueden ser - o pueden añadirse a - un ingrediente alimentario, un complemento alimentario, o un alimento funcional.

El alimento puede estar en forma de una solución o de un sólido - dependiendo del uso y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración.

Las bacterias descritas en el presente documento pueden utilizarse en la preparación de productos alimentarios tales como uno o más de: productos de confitería, productos lácteos, productos cárnicos, productos avícolas, productos del mar y productos de panadería.

Como ejemplo, las bacterias que pueden utilizarse como ingredientes en refrescos, zumos de fruta o una bebida que contenga proteína de suero, té naturales, bebidas de cacao, bebidas lácteas y bebidas que contengan bacterias acidolácticas, yogur, yogur bebible y vino.

La presente invención también proporciona, en un aspecto adicional, un método para preparar un alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico, comprendiendo el método mezclar la bacteria acidoláctica de acuerdo con la presente invención, con un alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional, complemento probiótico y/o ingrediente alimentario o para pienso (tal como un material de partida para un alimento).

Preferentemente, un alimento como se describe en el presente documento, es un producto lácteo. Más preferentemente, un producto lácteo como se describe en el presente documento, es uno o más de: un yogur, un queso (tal como un requesón ácido, un queso duro, un queso semiduro, un queso fresco), un suero de mantequilla, una cuajada, una crema ácida, un kéfir, una bebida basada en suero fermentado, un kumis, una bebida láctea, una bebida de yogur, una leche fermentada, una crema madura, un queso, un queso fresco, una leche, un filtrado de producto lácteo, un queso procesado, un postre de crema, o leche para lactantes.

Preferentemente, un alimento como se describe en el presente documento, es un producto alimentario fermentado. Más preferentemente, un alimento como se describe en el presente documento, es un producto lácteo fermentado – tal como una bebida láctea, una bebida de yogur, una leche fermentada, una crema madura, un queso, un queso fresco, un filtrado de producto lácteo, un queso procesado, un postre de crema, o leche para lactantes.

Preferentemente, el producto lácteo de acuerdo con la invención comprende leche de origen animal y/o vegetal.

Por leche se entiende que se refiere a la leche de origen animal, tal como de vaca, cabra, oveja, búfala, cebra, caballo, burra o camello, y similar. La leche puede estar en estado natural, puede ser leche reconstituida, leche descremada o leche complementada con compuestos necesarios para el crecimiento de las bacterias o para el procesamiento posterior de leche fermentada, tal como grasa, proteínas de un extracto de levadura, peptona y/o un tensioactivo, por ejemplo. El término leche también se aplica a lo que normalmente se denomina leche vegetal, es decir, extractos de soja de material vegetal, tal como plantas leguminosas (semilla de soja, guisante enano, lenteja y similar) o semillas de aceite (colza, semilla de soja, sésamo, algodón y similar), cuyos extractos contienen proteínas en solución o en suspensión coloidal, que se han tratado o de otra manera, que pueden coagularse mediante acción química, mediante fermentación ácida y/o con calor. Finalmente, la palabra leche también indica mezclas de leches animales y de leches vegetales.

En una realización, el término “leche” significa leche UHT comercial complementada con leche en polvo semidescremada al 3 % (p/p), pasteurizada calentando durante 10 minutos +/- 1 minuto a 90 °C +/- 0,2 °C.

En un aspecto adicional se proporciona un método para preparar un producto lácteo fermentado en el que dicho proceso comprende fermentar un sustrato lácteo en presencia de al menos la bacteria acidoláctica, el cultivo o el cultivo iniciador descritos en el presente documento. Preferentemente, el sustrato lácteo es leche. Preferentemente, el sustrato lácteo comprende elementos sólidos. Preferentemente, los elementos sólidos comprenden o constan de frutos, productos de chocolate o cereales.

SECUENCIA

Para algunas realizaciones de la presente invención, se prefiere que la secuencia sea una secuencia de ácido nucleico de origen natural.

La secuencia de ácido nucleico puede ser ADN o ARN de origen genómico, sintético o recombinante, por ejemplo,

ADNc. La secuencia de nucleótidos puede ser bicatenaria o monocatenaria ya sea representando la cadena en sentido o antisentido o combinaciones de las mismas. Las secuencias de ácido nucleico recombinantes pueden prepararse utilizando técnicas de ADN recombinante, como se describe en el presente documento.

5 La secuencia de ácido nucleico y los ácidos nucleicos incluidos en la presente invención, pueden aislarse o purificarse sustancialmente. Por "aislarse" o "purificarse sustancialmente" se entiende que las moléculas de ácido nucleico, o fragmentos o variantes biológicamente activos, homólogos o derivados de los mismos, carecen sustancial o esencialmente de componentes que normalmente se encuentran asociados con el ácido nucleico en su estado natural. Dichos componentes incluyen otro material celular, medios de cultivo de producción recombinante y
10 diversos productos químicos que se utilizan en la síntesis química de los ácidos nucleicos.

Una secuencia de ácido nucleico "aislada" o un ácido nucleico "aislado" carece típicamente de secuencias de ácido nucleico que flanquean el ácido nucleico de interés en el ADN genómico del organismo del cual se obtuvo el ácido nucleico (tales como las secuencias codificantes presentes en los extremos 5' o 3'). Sin embargo, la molécula puede
15 incluir algunas bases o restos adicionales que no afecten negativamente a las características básicas de la composición.

En un aspecto, se proporciona la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID N.º 19 o fragmento, variante, homólogo o derivado de la misma.
20

En un aspecto adicional, se proporciona la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 19 o un homólogo de la misma con al menos 75 % de identidad con la misma.

Adecuadamente, la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 19 o un homólogo de la misma tiene al menos 75 % de identidad con la misma, cuando se alinean los loci CRISPR de longitud completa.
25

VARIANTES/HOMÓLOGOS/DERIVADOS/FRAGMENTOS

La presente invención incluye el uso de variantes, homólogos, derivados y fragmentos de secuencias de ácido nucleico.
30

El término "variante" se utiliza para referirse a una secuencia de nucleótidos de origen natural que difiere de una secuencia de tipo silvestre.

35 El término "fragmento" indica que una secuencia de nucleótidos comprende una fracción de una secuencia de tipo silvestre. Puede comprender una o más secciones de secuencias contiguas largas o una pluralidad de secciones pequeñas. Preferentemente, la secuencia comprende al menos 50 %, más preferentemente al menos 65 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 %, más preferentemente al menos 96 %, más preferentemente al menos 97 %, más preferentemente al menos 98 %, más preferente al menos 99 % de la secuencia de tipo silvestre.
40

Preferentemente, el fragmento conserva 50 %, más preferentemente 60 %, más preferentemente 70 %, más preferentemente 80 %, más preferentemente 85 %, más preferentemente 90 %, más preferentemente 95 %, más preferentemente 96 %, más preferentemente 97 %, más preferentemente 98 %, o más preferentemente 99 % de actividad de la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre.
45

El fragmento puede ser un fragmento funcional.

50 Por un "fragmento funcional" de una molécula se entiende un fragmento que conserva o que posee sustancialmente la misma actividad biológica que la molécula intacta. En todos los casos, un fragmento funcional de una molécula conserva al menos 10 % y al menos aproximadamente 25 %, 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la actividad biológica de la molécula intacta.

55 El término "homólogo" significa una entidad que tiene una determinada homología con las secuencias de nucleótidos objeto. En este caso, el término "homología" puede equipararse con el de "identidad".

En el presente contexto, se pretende que una secuencia homóloga incluya una secuencia de nucleótidos, que pueda ser al menos 60, 70, 75, 85 o 90 % idéntica, preferentemente al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia objeto. Aunque la homología también puede considerarse en términos de similitud, en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.
60

Las comparaciones de homología pueden realizarse visualmente, o lo que es más habitual, con programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles en el comercio pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.
65

El % de homología puede calcularse sobre secuencias contiguas. Esto recibe el nombre de alineamiento "sin

huecos". Típicamente, dichos alineamientos sin huecos se realizan solo sobre un número relativamente corto de restos.

5 La mayoría de los métodos de comparación de secuencias se diseñan para producir alineamientos óptimos que tienen en cuenta posibles inserciones y deleciones sin penalizar indebidamente la puntuación de homología total. Esto se consigue insertando "huecos" en el alineamiento de la secuencia para tratar de maximizar la homología local.

10 Sin embargo, estos métodos más complejos asignan "penalizaciones por hueco" en cada hueco que aparece en el alineamiento. Típicamente se utilizan "costes de hueco afines" que imputan un coste relativamente alto por la existencia de un hueco y una penalización más pequeña por cada resto posterior en el hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos que se utiliza más habitualmente. Las penalizaciones altas por hueco producirán por supuesto alineamientos optimizados con menor número de huecos. La mayoría de los programas de alineamiento permiten modificar las penalizaciones por hueco. Sin embargo, se prefiere el uso de valores por defecto cuando se utiliza dicho programa informático para realizar comparaciones de secuencias. Por ejemplo, cuando se utiliza el paquete informático GCG de Wisconsin Bestfit la penalización por defecto de hueco para las secuencias de aminoácidos es de -12 para un hueco y de -4 para cada extensión.

20 Por lo tanto, el cálculo del % de homología máximo requiere en primer lugar la producción de un alineamiento óptimo, teniendo en cuenta las penalizaciones por hueco. Un programa informático adecuado para realizar dicho alineamiento es el paquete informático CGC de Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387). Como ejemplos de otros programas informáticos que pueden realizar comparaciones de secuencias se incluyen, pero sin limitación, el paquete informático BLAST (véase, Ausubel et al., 1999 ibid - capítulo 18), FASTA (Atschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 403-410), la serie de herramientas de comparación GENEWORKS y CLUSTAL. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para búsquedas fuera de línea y en línea (véase, Ausubel et al., 1999 ibid, págs. 7-58 a 7-60). Sin embargo, para algunas aplicaciones, se prefiere el uso del programa GCG de Bestfit. Una nueva herramienta, denominada secuencias BLAST 2 también se encuentra disponible para la comparación de secuencias de proteínas y de nucleótidos (véase, FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8).

30 Aunque el % de homología final puede medirse en términos de identidad, el propio proceso de alineamiento no está típicamente basado en la comparación por pares del todo o nada. En su lugar, generalmente se utiliza una matriz de puntuación de similitud a escala que asigna puntuaciones a cada comparación por pares basándose en la similitud química o en la distancia evolutiva. Un ejemplo de dicha matriz normalmente utilizada es la matriz BLOSUM62 – la matriz por defecto de la serie de programas BLAST. Los programas GCG Wisconsin generalmente utilizan los valores por defecto públicos o una tabla de comparación de símbolos a medida, si se proporciona (véase manual del usuario para detalles adicionales). Para algunas aplicaciones, se prefiere utilizar valores por defecto públicos para el paquete informático CGC, o en el caso de otros programas informáticos, la matriz por defecto - tal como BLOSUM62.

40 Una vez que el programa informático ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el % de homología, preferentemente el % de identidad de secuencia. El programa informático típicamente hace esto como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

45 Las penalizaciones por hueco deben utilizarse cuando se determina la identidad de secuencia, utilizándose después preferentemente los siguientes parámetros:

PARA BLAST	
APERTURA DE HUECO	0
EXTENSIÓN DE HUECO	0

PARA CLUSTAL	ADN	PROTEÍNA	
TAMAÑO DE PALABRA	2	1	Triple K
PENALIZACIÓN POR HUECO	10	10	
EXTENSIÓN DE HUECO	0,1	0,1	

50 Las secuencias de nucleótidos pueden incluir en las mismas nucleótidos sintéticos o modificados. En la técnica se conocen diferentes tipos diversos de modificación en oligonucleótidos. Estos incluyen esqueletos de metilfosfonato y fosforotioato y/o la adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los fines de la presente invención, se entiende que las secuencias de nucleótidos pueden modificarse mediante cualquier método disponible en la técnica. Dichas modificaciones pueden realizarse para potenciar la actividad o la vida útil *in*

vivo de las secuencias de nucleótidos útiles en la presente invención.

VECTOR

5 La(s) secuencia(s) de nucleótidos descrita(s) en el presente documento puede(n) presentarse en un vector. La secuencia de nucleótidos puede estar unida operativamente a secuencias reguladoras, de tal manera que las secuencias reguladoras puedan proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos a través de un organismo hospedador adecuado, es decir, el vector puede ser un vector de expresión.

10 La frase "vector de expresión" significa una construcción con capacidad de expresión *in vitro* o *in vivo*.

Preferentemente, el vector de expresión está incorporado en el genoma del organismo. El término "incorporado" preferentemente incluye la incorporación estable en el genoma.

15 Los vectores pueden transformarse en una célula hospedadora adecuada, como se describe más adelante, para proporcionar la expresión de un polipéptido que tenga las propiedades específicas como se define en el presente documento.

20 La elección del vector, por ejemplo, vector de plásmido, cósmido, virus o fago, a menudo dependerá de la célula hospedadora en la que vaya a introducirse.

Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores de selección – tal como un gen que confiere resistencia a antibióticos, por ejemplo, ampicilina, kanamicina, cloramfenicol o resistencia a tetraciclina. Como alternativa, la selección puede realizarse por cotransformación (como se describe en el documento WO91/17243).

25 EL vector puede comprender adicionalmente una secuencia de nucleótidos que permite que el vector se replique en la célula hospedadora en cuestión. Son ejemplos de dichas secuencias los orígenes de replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMBI y pIJ702.

30 CONSTRUCCIONES

El término "construcción" - que es sinónimo de los términos "conjugado", "casete" e "híbrido" - incluye una secuencia de nucleótidos directa o indirectamente unida a un promotor. Un ejemplo de una unión indirecta es el suministro de un grupo espaciador adecuado, tal como una secuencia intrón, tal como el intrón Sh1o el intrón ADH, de un intermedio del promotor y de la secuencia de nucleótidos de la presente invención. Esto mismo es cierto para el término "fusionado" en relación con la presente invención, que incluye la unión directa o indirecta. En algunos casos, los términos no incluyen la combinación natural de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína normalmente asociada con el promotor del gen de tipo silvestre y cuando ambos están en su entorno natural.

40 La construcción puede contener o expresar incluso un marcador, que permite la selección de la construcción genética.

Para algunas aplicaciones, preferentemente la construcción comprende al menos una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor.

45 CÉLULAS HOSPEDADORAS

La expresión "célula hospedadora" incluye cualquier célula que comprenda una secuencia de nucleótidos, una construcción o un vector.

50 Las células se seleccionarán para que sean compatibles con dicho vector y pueden ser, por ejemplo, células procariotas (por ejemplo, bacterianas), fúngicas, de levadura o vegetales. Preferentemente, las células hospedadoras son células no humanas.

55 Son ejemplos de organismos hospedadores bacterianos adecuados las bacterias positivas gram negativas o las bacterias gram positivas.

TÉCNICAS GENERALES DE METODOLOGÍA DE ADN RECOMBINANTE

60 La presente invención emplea, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de bioquímica, biología molecular, microbiología y de ADN recombinante, que se incluyen en las habilidades de un experto habitual en la técnica. Dichas técnicas se explican en la bibliografía. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 and periodic supplements; Current Protocols in Molecular Biology, c. 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, New York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn, 1996, DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons; M. J. Gait (Editor), 1984, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, Irl Press;

y, D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Press.

ASPECTOS ADICIONALES

- 5 En un aspecto adicional, se proporciona una bacteria acidoláctica que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 20 o una variante, fragmento, homólogo o derivado de la misma, preferentemente, un homólogo de la misma con al menos 99 % de identidad con la misma.
- 10 En un aspecto adicional, se proporciona una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 20 o una variante, fragmento, homólogo o derivado de la misma, preferentemente, un homólogo de la misma con al menos 99 % de identidad con la misma.
- 15 En un aspecto adicional, se proporciona un método para identificar una bacteria acidoláctica que comprende la etapa de explorar una bacteria para determinar la secuencia expuesta en SE ID N.º 20 o una variante, fragmento, homólogo o derivado de la misma, preferentemente, un homólogo de la misma con al menos 99 % de identidad con la misma.
- 20 En un aspecto adicional, se proporciona un microorganismo, una cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada según el tratado de Budapest por Danisco Deutschland Niebull GmbH, Buch-Johannsen Strasse.1, Niebull -D-25899, Alemania en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D - 38124 Braunschweig) con el número de depósito 18344 el 14 de junio del 2006 o un mutante o variante de la misma que tiene una o más de las características de la cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada
- 25 Adicionalmente, la invención se describirá ahora con Ejemplos con la intención de ayudar al experto habitual en la técnica a llevar a cabo la invención y de ningún modo pretender limitar el alcance de la misma.

Ejemplos

- 30 Ejemplo 1
- Streptococcus thermophilus DSMZ-18344 es un acidificador rápido de la leche.*
- 35 La velocidad de acidificación de la leche durante el proceso de fermentación es de -0,0153 upH/min, en comparación con -0,0129 upH/min, -0,0167 upH/min y -0,0209 upH/min de *Streptococcus thermophilus* CNCM 1-2423, *Streptococcus thermophilus* CNCM I-2980 y *Streptococcus thermophilus* CNCM 1-2425, respectivamente.
- Ejemplo 2
- 40 *Streptococcus thermophilus DSMZ-18344 genera leche fermentada con una viscosidad superior.*
- 45 Las leches fermentadas recientes se producen a escala de laboratorio. La base láctea se compone de leche UHT comercial complementada con leche en polvo semidesnatada al 3 % (p/p). Después de mezclar, la base láctea se calienta durante 10 minutos +/- 1 minuto a 90 °C +/- 0,2 °C. Después, la base se enfría a 43 °C +/- 1 °C en un baño de agua regulado a 43 °C +/- 1 °C y la leche se despacha en vasos de laboratorio de vidrio de 125 ml.
- 50 La leche se inocula con la bacteria a una proporción de 1E6-1E7 ufc/ml. La fermentación se realiza a 43 °C +/- 1 °C sin agitación y se detiene cuando el pH alcanza 4,6 +/- 0,05. En ese momento, la leche fermentada reciente se enfría rápidamente a 6 °C +/-1 °C en menos de 1 hora. Finalmente, los productos se almacenan a esta temperatura durante 28 días.
- Después de esta producción de leche fermentada la viscosidad se mide utilizando un viscosímetro de Brookfield.
- 55 La viscosidad en la leche fermentada es de 68 Pa.s después de 14 días de almacenamiento a 6 °C.
- Normalmente una cepa identificada como altamente texturizante genera leche fermentada con una viscosidad superior a 45 Pa.s, un límite elástico de Casson inferior a 12,0 Pa y un área tixotrópica inferior a 1.000 Pa/s.
- 60 En la Tabla 1 se muestra una comparación de las propiedades reológicas de tres cepas texturizantes de *S. thermophilus*.

Ejemplo 3

Análisis molecular de Streptococcus thermophilus DSMZ-18344

- 5 El método EPSAD PCR-RFLP es un método molecular para establecer la estirpe genética entre cepas de *S. thermophilus*.

El ADN genómico de *Streptococcus thermophilus* se purificó utilizando el kit de DNeasy Tissue (Qiagen). El ADN purificado se amplificó después por PCR con los siguientes parámetros:

10

Composición de la mezcla de reacción de PCR (50 µl):

- tampón para ADN polimerasa x1
- MgCl₂ 2 mM
- 15 - dNTP 200 µM de cada uno
- ADN genómico de 100 a 500 ng
- cebador EPSA632 (5'-AAATgAATTCAgAgCAAgCACTTg-3') 200 nM
- cebador EPSD1064 (5'-gTCATgTCAACTTTATTAaggACg-3') 200 nM
- ADN polimerasa 1,25 unidades
- 20 - H₂O csp 50 µl

Parámetros de amplificación:

- predesnaturalización a 94°C durante 1 minuto
- 25 - 35 ciclos con desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 56°C durante 30 s, elongación a 72 °C durante 3 minutos
- post-elongación a 72 °C durante 6 minutos.

30 Después de la amplificación, el producto de la PCR se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %. El tamaño del producto de amplificación tiene un tamaño de aproximadamente 2,5 kb.

El producto de la PCR se digirió después con dos enzimas de restricción, *FokI* y *MnII* en las siguientes condiciones:

- producto PCR de 15 a 30 µl
- 35 - tampón 2 (New England Biolabs) x1
- BSA (New England Biolabs) x1
- Enzima FokI (New England Biolabs) 1 unidad
- Enzima MnII (New England Biolabs) 1 unidad
- H₂O csp 50 µl

40

Incubación a 37°C durante 1 hora.

El producto digerido se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 3 %.

45 Aplicado a *S. thermophilus* DSMZ-18344, esta cepa se agrupa en un grupo genético conocido como CL0189. Esto se confirmó adicionalmente secuenciando la parte proximal de su operón *eps* (es decir, la región cromosómica diana con el método EPSAD).

El perfil EPSAD PCR-RFLP de *S. thermophilus* DSMZ-18344 se muestra en la Figura 1.

50 Referente a esta Figura, *S. thermophilus* DSMZ-18344 muestra estirpe genética con el perfil de *S. thermophilus* CNCM 1-2425 que es la cepa representativa del grupo genético CL0189.

La parte distal del operón *eps* también se secuenció y se comparó con la disponible en la bibliografía. Inesperadamente, esta parte del operón *eps* de *S. thermophilus* DSMZ-18344 era distinta a la de la cepa *S. thermophilus* CNCM 1-2425. Sin embargo, es muy similar a la de *S. thermophilus* CNCM 1-2423 y a otras cepas dentro del grupo genético de *S. thermophilus* CNCM 1-2423 (en concreto CL0089 que también contiene *S. thermophilus* CNCM 1-2426 y *S. thermophilus* Sfi39 (entrada al Genbank AF373595)).

60 La organización esquemática de la parte distal del operón *eps* y las similitudes entre las cepas se muestran en la Figura 2.

Los datos de secuencia de la parte distal del operón *eps* y los datos de agrupamiento EPSAD sugieren en conjunto que el operón *eps* de *S. thermophilus* DSMZ-18344 es un operón quimérico constituido por la parte proximal del operón que procede de *S. thermophilus* CNCM 1-2423 (o cepas relacionadas) y por la parte distal del operón que procede de *S. thermophilus* CNCM 1-2423 (o cepas relacionadas).

65

Esta característica inusual puede ser útil para desarrollar un método para detectar específicamente *S. thermophilus* DSMZ-18344 (o cepas relacionadas de otra *S. thermophilus*) como se describe en el presente documento.

5 La cepa *S. thermophilus* CNCM 1-2423 es una de las cepas de acidificación rápida que presentan propiedades texturizantes de interés en leches fermentadas, mientras que *S. thermophilus* CNCM 1-2425, aun siendo una cepa de acidificación rápida, no tiene estas propiedades texturizantes interesantes. En *S. thermophilus*, la parte distal del operón *eps* contiene genes que codifican glucosiltransferasas. Se sabe que estas enzimas son responsables de la estructura de las unidades polisacáridicas que componen el exopolisacárido y se cree que la naturaleza de este exopolisacárido es al menos parcialmente responsable de las propiedades texturizantes de una cepa. Por lo tanto, la estructura quimérica del operón *eps* puede explicar sus prestaciones texturizantes.

Ejemplo 4

Secuencias Espaciadoras CRISPR de *S. thermophilus* DSMZ-18344

15 Las secuencias espaciadoras en el locus CRISPR son características genéticas que son muy específicas en una cepa o en cepas relacionadas.

20 Las secuencias espaciadoras del locus CRISPR 1 de *S. thermophilus* DSMZ-18344 se han secuenciado y comparado con las de *S. thermophilus* CNCM 1-2425, *S. thermophilus* CNCM 1-2423 y con otras secuencias espaciadoras. Las únicas similitudes se descubrieron con *S. thermophilus* CNRZ385 (número de acceso Genbank DQ072992) y CNCM 1-2425 (y cepas relacionadas). De manera interesante, se identificaron las secuencias espaciadoras dentro de este locus CRISPR que tienen una organización diferente (5 espaciadores ausentes) y 1 secuencia espaciadora adicional.

25 El lisotipo de *S. thermophilus* DSMZ-18344 y las diferencias observadas entre el lisotipo de *S. thermophilus* DSMZ-18344 y el de las cepas del genotipo CL0189 se muestran en la Tabla 2.

Ejemplo 5

30 *S. thermophilus* DSMZ-18344 es resistente a fagos

35 Durante las 2 últimas décadas se ha recopilado una biblioteca de más de mil fagos virulentos para cepas industriales de *S. thermophilus*. Esta colección de fagos se estudió exhaustivamente y se estableció su espectro de hospedador. Esto permitió la identificación del conjunto representativo de 60 fagos de todos los espectros de hospedador identificados dentro de la colección de fagos.

40 Cada uno de estos fagos representativos se ensayó en las cepas DSMZ18344, CNCM 1-2423 y CNCM 1-2425, como se describe en el presente documento.

45 Se descubrió que CNCM 1-2423 era sensible a los fagos D4126 y D3215. Se descubrió que la cepa CNCM 1-2425 era sensible al fago D4369. Por el contrario, la cepa DSMZ-18344 era resistente a todos los fagos representativos ensayados.

TABLA 1

Nombre de la cepa	Viscosidad (Pa.s)	Límite elástico de Casson (Pa)	Área tixotrópica (Pa/s)
DSMZ-18344	68	6.48	627
CNCMI-2425	28	14,43	21780
CNCMI-2423	49	9,28	1035

TABLA 2

Cepa	Genotipo	Parte distal del operón <i>eps</i>	Sensibilidad de CNCM 1-2425 a fagos	Sensibilidad de CNCM 1-2423 a fagos	Sensibilidad a otros fagos	Texturizante
DSMZ-18344	CL0189	Tipo CNCM I-2423	No	No	No	Sí
CNCM I-2423	CL0089	Tipo CNCM I-2423	No	Sí	No	Sí

Cepa	Genotipo	Parte distal del operón eps	Sensibilidad de CNCM 1-2425 a fagos	Sensibilidad de CNCM 1-2423 a fagos	Sensibilidad a otros fagos	Texturizante
CNCM I-2425	CL0189	Tipo CNCM I-2425	Sí	No	No	No

SECUENCIA (5'-3')

- 5 SEQ ID N.º 1
Secuencia líder de la secuencia CRISPR1 de *S. thermophilus* DSMZ-18344
actatgtgggtataaaaacatcaaaatttcatttgag
- 10 SEQ ID N.º 2
Espaciador (1) de CRISPR1 de *S. thermophilus* DSMZ-18344
aatatctacaggtcactacaaagctacgct
- 15 SEQ ID N.º 3
Espaciador (2) de CRISPR1 de *S. thermophilus* DSMZ-18344
gttggggtgtgtttgtaacggcgtatgcta
- 20 SEQ ID N.º 4
Espaciador (3) de CRISPR1 de *S. thermophilus* DSMZ-18344
tcaatcaggtgacggtgatgcttatattaa
- 25 SEQ ID N.º 5
Espaciador (4) de CRISPR1 de *S. thermophilus* DSMZ-18344
catacatgatagtttgcaacactttgat
- 30 SEQ ID N.º 6
Espaciador (5) de CRISPR1 de *S. thermophilus* DSMZ-18344
tcagcatttggttacatgaccacgctg
- 35 SEQ ID N.º 7
Espaciador (6) de CRISPR1 de *S. thermophilus* DSMZ-18344
caatcaacaggttgactgattataacggt
- 40 SEQ ID N.º 8
Espaciador (7) de CRISPR1 de *S. thermophilus* DSMZ-18344
tagctacacatgaattttattacaatggtg
- 45 SEQ ID N.º 9
Espaciador (8) de CRISPR1 de *S. thermophilus* DSMZ-18344
ccgttctcaaacgttaaattccaaggtg
- 50 SEQ ID N.º 10
Espaciador (9) de CRISPR1 de *S. thermophilus* DSMZ-18344
gctgcgattatgacaatgctgtctgtaagg
- 55 SEQ ID N.º 11
Espaciador (10) de CRISPR1 de *S. thermophilus* DSMZ-18344
gaagaatttataataaagatggttctgct
- 60 SEQ ID N.º 12
Espaciador (11) de CRISPR1 de *S. thermophilus* DSMZ-18344
aggcagaaaagaagtattttgtaagtatg
- 65 SEQ ID N.º 13
Espaciador (12) de CRISPR1 de *S. thermophilus* DSMZ-18344
aaatggtttatcgacaagaaaatgaagct
- 70 SEQ ID N.º 14
Espaciador (13) de CRISPR1 de *S. thermophilus* DSMZ-18344
ccaaattgcattatacaaaacgctccttc

ES 2 610 811 T3

SEQ ID N.º 15
Espaciador (14) de CRISPR1 de *S. thermophilus* DSMZ-18344
atcctaactgctttgctaactacatcatgg

5 SEQ ID N.º 16
Espaciador (15) de CRISPR1 de *S. thermophilus* DSMZ-18344
atcctaactgctttgctgactacatcatgg

10 SEQ ID N.º 17
Espaciador (16) de CRISPR1 de *S. thermophilus* DSMZ-18344
taacaagataagattagctcttctacat

15 SEQ ID N.º 18
Secuencia tráiler de la secuencia CRISPR1 de *S. thermophilus* de DSMZ-18344
ttgattcaacataaaaagccagttcaattgaacttgcttt

20 SEQ ID N.º 19
Secuencia CRISPR1 de *S. thermophilus* de DSMZ-18344

actatgtgggtataaaaacatcaaaatctcatttgagggtttttgtactctcaagatttaagtaactgta
caacaatatctacaggtcactacaaagctacgctggtttttgtactctcaagatttaagtaactgtacaa
cgttgggggtgtgtttgtaacggcgtatgctagttttgtactctcaagatttaagtaactgtacaa
tcaatcaggtgacgggtgatgcttatattaagttttgtactctcaagatttaagtaactgtacaacat
acatgatagtttgtcaacacttttgatggtttttgtactctcaagatttaagtaactgtacaactcagca
tttgggttacatgaccacgctcgtggtttttgtactctcaagatttaagtaactgtacaaccaatcaaca
ggtttgactgattataacgggtgtttttgtactctcaagatttaagtaactgtacaactagctacacatg
aattttattacaatgggtggtttttgtactctcaagatttaagtaactgtacaacccgcttcttcaaacgt
taaattccaaggtgtgtttttgtactctcaagatttaagtaactgtacaacgctgcgattatgacaatg
ctgtctgtaaggggtttttgtactctcaagatttaagtaactgtacaacgaagaattttattaataaagat
ggttctgctgtttttgtactctcaagatttaagtaactgtacaacaggcagaaaagaagattttggta
agtatgggtttttgtactctcaagatttaagtaactgtacaacaaatggtttatcgacaagaaaatgaag
ctgtttttgtactctcaagatttaagtaactgtacaacccaaatttgcatatacaaaaacgctcctcgcg

ttttgtactctcaagatttaagtaactgtacaacatcctaactgctttgctaactacatcatgggttt
ttgtactctcaagatttaagtaactgtacaacatcctaactgctttgctgactacatcatgggtttttg
tactctcaagatttaagtaactgtacaactaacaagataagattagctcttctacatggtttttgtac
tctcaagatttaagtaactgtacagtttgattcaacataaaaagccagttcaattgaacttgcttt

25 SEQ ID N.º 20
Grupo génico EPS de *S. thermophilus* DSMZ-18344

gctgagccagcttactagcgtacaggcacctactaaggttgataagaacaatatcgaggt
cttgatgtcagctctcaaaaaagataaaaaagttgatgttaaagttgatgatggtgcttc
atatcaagaagcttatgataatctcaagctctggcaaactctaaagctatggctcttgagtgg
ctcttatgctagcctattagagctctgtcaatagtaaccttgcttcaaactcaaaaaaat
ttatacttataaaattaaaaagaagaataacaactctgcaaaccaagtagattcaaaagt
cttcaatatttatattagtggtattgatacctacgggttcgatttcaacagtgctacggttc
agatgtcaatattattatgacagtaaacatgaatacacataagattctcttgacgactac
tccacgtgatgcatacgttaagattcctgggtgggggcaaaccagtatgataaattaac
ccacgcaggtatttatgggtgtgaaacatctgaacaaactctggaagatctatatggtac
taagattgattactatgcacgaattaacttcacatctttccttaagttgattgaccaact
tgggtgtgacagtcataatgatcaagctttcacaagtcttcatgggaagtttgattt
cccagttggagatatccaaatgaattcagagcaagcacttggatttggctcgtgaacgcta
tagtttagatggcggagataatgaccgtggtaaaaaccaggagaaagtcatttctgcat
tgtaaaacaagttggcttctctaaagtctgtatcaaactttacttcaatcgtaataatct
ccaagactctgttcagacaaatatttctttggataccattaatgctttggctaatacaca
acttgattcaggctctaaatttacagtaacgtctcaagcagtaactggtagcaggttcaac
cggacaattgacctcttatgcatgcaaaattctagctttacatgatgaaactagataa
ttcgagtgtggcaagtgacctctcaagctatcaaaaaatctgatggaggaaaaataagtgat
tgacgttcaactcacatattgttttgatgttgatgatggctctaaaactttagaagaag
tttagacctcattgggtgaaagttatgccagggggtacgtaagattgtttcaacatcca
tcgtcgtaaggggatgtttgagactccagaggataaaaattttgccaacttttctaaggt
aaaagcagaagcagaagcactttatccagacttaactatttattatggaggtgaacttta
ttacaccctagacattgtggagaaacttgaaaagaatctcattccgcgcatgcacaacac
tcaatttgctttgatgtgagtttagtgctcgcacatcttggaagaaattcatagtgggct
tagtaatgttttgagagcgggggtaacgcctattgttgctcatattgagcgtatgatgc
cctcgaagaaaatgctgatcgtgttagagaaattatcaatatgggctgctatactcaagt
caatagctcacatgtcctcaaaccaaagctctttggagataaagaaaaagtaagaagaa
acgtgttcgctttttcttggagaaaaatttgggtcctatgggtgctagcgcacatgcataa
tcttgggcccagaccaccatttatgaaagatgcttatgaaattgttaaaaagaactacgg
ctccaaacgtgctaagaatctttttatgaaaaatcccaaacattactagaaaatcaata
ttataggagatattatgaaatcaagataaacactaaaagtgatgaaatcgacgtactagca
ttgctacataaaactttggacgaagaagcttttgattcttttcacagctttttatttcgct
gctttcagtttcttaggtacttatttctttatccaaccaacatatacatcaacaacgctt
atctatgttgtaatcaggcaacagataataataatctttctgctcaagatttgcaagct
ggtacctatttggcaaactgactataaagagattattacatcaaatgatgtattatcagaa
gttattaaagatgaaaaattgaatttgagtgaggcagaactgtctaaaatggtttcagtt
aatattcctactgatactcgtcttatttcaatttctgttaatgctaaaactggtcaagat
gcgcaaacacttgctaataaggttcgtgaagttgcttcaaaaaaatcaagaaggtgaca
aaagttgaagatttcacaatgctcgaagaagctaaattgccagagtcaccatcttcca
aatatcaaaccttaatgtgcttcttggggcagtgcttggaggattccttgcagtggttgg
gtattggtagctgaaatcctagatgatcgtgttcgccgtccagaagatgtggaagatgcc
cttggaaatggcacttcttggaaatgtccctgatacagataaaaatttaaggagaagaatg
cctctattaaagtttagtaaaatctaaagtaaacctttgccaacaacagaagagattac
aatgccattcgcaacaatattcaattttctgggtgctcagattaaagtgattgcattagc
tctgttgaagctgggtgaaggaaaatcaacgacatctcttaacttggcgatttcatgtgct
agtgttgggctccgaacacttctgattgatgctgatactcgttaattctgtttttcaggt
acatttaaatcaaatgagccttataaaggtctttcaaattttctttcaggaaatgccgat

ctaaatgaaacgatttgccaaactgatatttctggtttggatgttattgcatctggctct
gttccacctaatccaacaagtcttttgcaaaatgacaatttttagacatttgatggaagt
gctcgtagtcggttatgattatgtcatcatcgatacaccaccagttgggttgggtattgat
gcagttattattgcccatcaggctgatgccagtcttttgggttacagcagctgggaaaatc
aaacgtcgtttcgtaactaaggccgtcgaacaattggaacaaagtgggtctcagttctta
gggtgctgctccttaataaagttgacatgacagttgataaataatggatcatatggttcttac
ggatcatatggttcttacggatcatatggtagtacaggaaaaaacagaccaaactgaa
ggtcattcaagagcacatcgtcgtagaaaaggatagcattaatggggatgatgcggtcc
ttataccttaacagattaaaaaggggttagagtgaaagaaaaacaagaaatcgtcgc
ttgaaattgggtattatacagttgggtgtgggtgttttcgcagccatggtagctagtaaaa
taccatatacagagattaccaaggaagtattgtccttttaggtgtcgtacatgtagtgt
cttactatatacagtagttattatgaaaatcttaagtatagaggctacttggatgaaactca
ttgcaactgtcaaatattgtttcatatttgcctcaattgcaacatttctctcgttttttg
cagatggaagttttcaatctcacgtcgcggacttctttacgtcacatgatctcaggtg
ttctcttatacgttacaaaactgttcttaagtatttccgctcatctatttatacacgctc
gtaaaagtaacaagaatattctcttgatttctgatcaggcacgtcttgataatgtttgt
ctcgtatgaaagacaatattggatggtaggattacagcagtttgggtcttgataatcctt
atcttactgatccatttatcaagagtggttaaaccctgaaaatttgattgaaatgagcac
actcagtagtagaccaagttttgattaatctgccaagtgggcagtataagatttgggatt
atgcatcaccttttgagatcatgggaattccagtttctattaatttgaatgcccttgaat
ttatgagtcagggtgaaaaacgtattcaacaattgggtcctttcaagttgttacgtttt
caacgcaattttatagctatggagatattctggcgaaaacgtttcctcगतatctgtggag
ccctagttgggttgggtgctctgtgggattgttggaaatcttctttatccacttattcgta
aggatgggtgggcccagccatttttgcctcaagaccgtgtgggagaaaaatggacgtatctta
agttttataaattccgttctatgtgtgttgatgcggaagaaatcaagaagaatttgatgg
cacagaatcaaatgtctgggtgatgtttaagatggacaatgatccacgtattaccaaaa
ttggacgtttcattcgtaaaaacaagtcttgatgaaactccacaattttggaatgtcctaa
aaggtgatatgagcttgggtgggacagtcctccaacagttgatgagatgaaaaatata
cacctgaacagaaaacgtcgtttaagttttaaacctgggtatcactggctttggcaagtaa
gctgtcgaagtgaattactgattttgatgaagttgtaaaactagacgttggctatttgg
acggatggacaatctggcgtgatatacaaatcttattgaaaacaattaaagtagtagtaa
tgaaggatggagcaaatgatggctttcaccaatttcttttaattgggtgattaaatgacaaa
aacagtttatatcgttgggtctaaagggattccagcaaaaatattgggtggatttgagacctt
tgttgagaagttgacagagttccaacaagacaaaagatataccaatattatgtagcttgtat
gctgggaaaactctgcaaaatcagacattacagcagatgatatttcaaacttcgcaacagaa
ccctaaaaagaactccctaacggctcgtggctactttgttttagtctaaacactttgaaatag
tcctacaagctcatagtttcccttttattagttgggtccaaggccaattctattttttgaa
gcaaaagaatattggggagcgccttcccttatttactgatattgtaaacctggaattactggt
tattggacgacacatggtcgaagtaaagttctttttcctcaacgagcagatttagaactc
tattatctcaatattacagcaccaagaacgacatcaagcttctaatacgtacaatttca
caaatcattaacggattggacgcttactaataaaatattatgaaaaaatatttgaatcata
actcgaaaaatattaaaagattagatattatataaaaaccgaattgctagtttaatttc
attgaaaaataaataagtcgtgctatcctaactcttaaacactaagcatttagaaagcgca
cgacttataatgacttataatagcacacttccaaaagtttttgtttatttactgacaacca
ttgagacgctttatcaaacgagtggtcccttgagggttcaaaaccgaaagaacgtccatc
tcgcaacatcagattgcttagttatcgcttgttacctatggggcgtactgcattttagtg
aaacgcttaaagcaaacgaccaattggctcaaagtttatttccctaatttcttagaatatt
ctcacttgtccgctgtgtaatgccctcttaccgagtatccaagtcatttcgccaagcac
tcgtatttaaagaggttgaaggaattagtgatccattattgacagcttccccattcctt
tgtgtcagttctattcgtaatctcagaagcaaatggtccttggagattatgcaaatgttggct
acaatgctacaaaaggacagtaacttctatggatgtaaatgtcatgcttttagtcagtgaat
caggctatgtcatagactacacaattactcctgcttcaatggctgatagttcaatgaccg
aggaagtgttagtcaatttgggacaccaacagtccttggagatattgggatatttaggtc
agtcactgcatgataggctggaattaaaaggaattgatctaattacacctgtcaggaaga
acatgaaacaaaagaaaattctttccctaattttcaaaaactgaaaaagtgattgagc
gagtttctctttttgacaaatctaggagctgagcgttgtaaaagtcggtcgcctcaag
gttttcaattgaaattagagatgatacttttagcgtattctttactgttaaaatcagcta
aatcactggaaccagagactttaagatattctatcgggtatcaagtcatggctaaataat
caactagcaattcgggtatcataaaggagtgatttaataaaaaaaattacaatagcagtt
gcaacgcataaaaaatatacaatgcaaaaagataatatttctaccaattgaaatgtgga
gcagttttaagaaaaatcacctagactatattgctgatgatagtgagataatatttct

gaaaaaaacaagaattattcagagttaacagcactatattggttatggaaaaataatgat
 tctgagtataaaggattagcacactatagacgtcatttttcagataaaaagggtgagtatt
 ttttctacaggtaattttgataataacttgataggacggctacttgaggaacatttagag
 aagtttgatattatacttccaagcttcgacattactatattgaaacaatagaatctcac
 tataaacatacgcattttgaaaaagatttattagcaacagaagaataattaaaaacta
 tatectgactatcttgatttttattatagtgactaaaaagaaaatctgctcatatgttt
 aatatgtttattatgaaagataaatatttcaataattattgtgaaatggttattttcgatt
 ctttttgaattagaaaaagtagatatttcaagaatattctccctttcatgcaagagta
 ttgggtcgtgtagtgaattttattagatgtatggattttcaagaataatttaaatttc
 actgaaattccagttatgtttatggaaaagcaaaattgggtgggataaatctaaaagattt
 atttctgcaaagctttcaacaaaaaatattattagactaggagaaataaattgcttaca
 atcggataaattttaataattttatgactattttcgattattatatacataaaacagta
 ttttctccggtctttatgtttaattcactctttttattaataatattctctttctctatg
 aggttatataaattgagagaatattctatcaaatcaatagaagtaattgtgttagggatg
 atattctctctttaggagattttgtactcgtattgtttctcatgaatttttaaaaaat
 caaataatgtttattaattacgatgataatttaaattgaaattggacttttttaaaaaat
 ctttgatagttgttaaccacaggaacgtattctctatttttttcttgaattcctt
 ttaggaggaggttcatacttagaattgagaaatattgatattgggatataaatggagctgaa
 ccacttattacgaatcctctcgtaaatatattaacaagatatatatcgggaccagggttg
 actgctttgatcccattttctatttttttctaaattaggaaaaaaacattaaattttcc
 ttaattattttatgaaatctgttttggcaacattatcatccggtggtagaattttactt
 gtatatactattattcaattgtttataggattatcttattcaaaaaaaatataccaaaa
 aaaattaagaaagtagtcataatcaagattatatttttttatctataattgtctta
 tctaacatcagaagttctaacagtatatatagagcgttttatgcatacttttcgggccct
 gtattcttttctacttggatgactgatgttgatacttataatattcattcacatgga
 ttaggatttatttatcccatcacatatctattaaattcattttgtaatataataggaatt
 cctaactcगतgttggtaatgttgcatgtggcaaggaatgcctcagaatgattgggta
 ggcgattccctaataatcaatcgatgaacgcttttagtacacttttctattttctataaa
 gattttcgaaatttggagttgcttggcttttcttctttttgggagttttgtggtttt
 atttatttttaagcgtttatcgaaaagaaaaagtaaatatctagtctattatttattaggg
 gtacaggcaattatcggatcttttatttttggcaattggggagtagtgcgtttttctta
 agtattgtatttacaatattaagtctgaaatcaaagaaatcataactatagaaaaggaga
 taaaatagacaatcagcatagtaatcccagtttataatgttcaagattacataaaaaag
 tgtctagattctatattaagccagacattttcagatttagaaattattcttgttgatgat
 ggttctactgactgagtggagaattttgtgattattattccgaaaatgataaacgtatt
 aaagtaatccacacagcaaatgggggacagtcggaagcaaggaacgttggaaatcaaaaat
 gccacatcagaatggataaacatttattgattctgatgactacgtttcttctgattatata
 gattatttataaatttgattcaagtaacaaatgcagatatttcaatagctagtttacc
 tataatcacactaaaaagataaattaagcacggtaacgggtgaagtagctcttatggatgca
 aaaactgcaatcggagaatgttactgaatgaaggtttcgatagggagttttggggaaa
 atgtatcgaacggagatttttaataaataaaattcgtttcaggaaaaactatttgaagat
 tctttaattacataccagatattttcagaagcttcaacaattgtttttggagcaaaagga
 atttatttttatgttaacaggaaaaatttctactgttaattggtacttttaataaaaaaag
 ttgatcttattgaaatgaatgaagaagcaataaagtttattaaacataaaatttcagat
 cttcatctgaagcacaatcgatgatattgggcatatttttagtacactaaatcaagtt
 ttaatcatcaactaatgaacacgatattgatttatatgcgccacaattagtagcttatctc
 cttaaacaggataaattcataaaaaggaatacttttattccaaaagagataagattgca
 ttttttatttttaaaaaattttggtttaagacatatcgtaattgtttggaatttatattta
 aaaatgacaagataaaaaacaataatgaaagataaaaaataatgaaaactgctacaattac
 ttacattcagcacataataatggatctatcttttctacagtcatttgctttgcagagaa
 agataaatctatgggatagataacgaaattataaattatattccactcaaattgctcag
 tagtttttaagaaccaagtgcaaaagatttataaggttaacaacggttacgatgttgctac
 ggccgcaacccgaagaagccgctgaatacgttgattgggctagttgtcggctgtatata
 ggattgtttatgcagcagattcggatgctcacggatcgccgcttcacgaagctgatttc
 ttaactgatgaattaggattgactagtttaggcttgggttaaccatcaacatcaccattca
 atgaagaacaggccttgaatctgaacgggtggctatcatacgcataacgatcaaacatct
 tcacaagcgatgaaacaggtttaggagggtgctagatgtttaaactgaaagaaaagaata
 taacgactacggcacaattaatctcaccacgattaatgaacccatgtcggctactgag
 agcagattaaaacaattcgaaccaatatacaattttgcccgtactgaccataagctacgaa
 ctttgatggtagcttcggccatgcttggcgagggtaaatcgacagtaagtggaacttag
 cagtggagtagccaaggaaggaaggcaagcaagcttactggtcगतgctgactgcca

cgaccaacgattcataagacatttggccttaaaaaaccataagggattaagttcatggtta
gccaatcagattgacgatgtgaatgatgcaattcatcccgtcattggcaatctataattg
tataaatagtagtataactttataacaatggagtggttttaaatgaatcttttggtttagtca
atgtcacattacattgaaaatttaaaaaatgtaactttttgcggtggaatagctatgta
caatgattttctgggtggcagactaatcaagtataaaaatagcttatactagttgacaaca
tcccgtgataattattaacttatcaagtacaggccaaaatactggagcttaacaggaact
gttagaatatgattttatataattaggagtagaataaagagatgaatccattaatatcaa
ttattgttccaacatataatgttgaaaaatataataggacatgtattgaatcaatcttag
ctcaaacatatacgcaatattgaagtcattatagtaaatgatggtagcacagatcagtcgc
tagcagtaatttccgatttaactctgtagtcataataattaaggtaatcaacccaaaaaa
accaaggattatcagtagctcgaacaactggattgatgacggcaactggtaatatatag
ctttttagatgagatgacaaaatgaagccagactttgttagctcgctctatcaaattg
ctgacaaaacaggagctgacattgtgctgggtcatttcgagactttaatggcaatattc
ctaaaggctgggttccagatttcaatgttccaaccaattatgggacaatagtagacc
aattcttatccagcaacatatactttttagtgggtcgagatctatagggctagatttta
ttaatagtaatacatatacgatttacaccagggattctatttgaggatgcagattttacaa
taagagcttatatgctcgctaagttagttgctacatcacctgaaccaaattatgcatata
gaataaatcgtccaggaagtataattaaccacaaaaaccacaaaaaatgccccaaaaatgt
ctctttcagaagaaaaattatatacacaatttattagtagttaaagcatgaaaaatctg
atgttttatgtagtttaattctaaagtctatttatgcatgtatgagagattggacgggaa
ttattgtgaggaataacctatcgttggataggaagaacagttgttttgatactgctctca
ctctaataaaaagaaataataaattctaggcccttaaaagaaaaaatcaaatttttaacaa
aggttattattattaaggcgaaaaaccattaagccgttaaacgaaaatccaaagggttca
tatacaattatgttaattatggattttttatatacttcaatgggttcattaatcactgaat
ttgattatcttgttttaatgaatgtgaagtcattcgggttaaggggagcttttgattgtc
tagttagctatctggacagatgttaagtgttaattacagtggaagcagatgaaaacttat
taaaagttattctgcttgattaagaatggtaagatttcaccatctataacttttatag
aacttaggtgacagggaccacaatttttaaatccttctggttatatagtttttggtttaa
tatttttccgggaggatttaaatgcaaatagtaaaaaattatctttataatgcaatgtat
cagggtctttataattattgtgccattacttaccattccttatttgtcaagaattttgggc
ccttcagggtattggaattaactcatataccaattctattgttcagttattttgttttattt
ggtagtataggagtcggtttgtatgggaatcgtcagattgcctttgttagggataatcag
gtcaaaatgtctaaagcttttatgaaatatttatttttaagactattaacaatatgttta
gcatatttattgttcggtgcttttttaaccattaatgggtcagtatcatgaatactatttg
tttcaatccattgctatagttgcagctgcatttgatatactcttgggttttttatgggaatt
gaaaattttaaagtaactgtatataagaaattttatagttcagttacttgctctattcagt
attttctattttgtcaaatcttacaatgatttgaatataatataatgataacagtttta
tctacattaatggtaatttaactttttcccaagtttacacagatatactcgtaaggtt
aactcgtgaattaaggccaataaagcatttaagcaatcttagttatgttttatccca
caaatgctgtccaaatttatgggttttgaataaaaacaatgttaggttcatggattct
gtcacgagctccggctttttgatcagctcgataaaaatagttaaactgggtttggctatt
gctagtgaacaggtactgtcatgttgccacgtgttgcaaatgcctttgcacatagagag
tatagtaaaaatgaaggatcatgtacgcaggtttttcttttgggtcggcaatttcgatt
cctatgatgtttggctgatagctattactcctaaattcgtgccactttttttacatct
caatttagtgatgttattcctgtgttaatgatcgagtcattgcaattatttttatagct
tggagcaacgcaataggtaatcaatatcttttaccactaatcaaaaatagtcataataca
gtgtcgggtgttcatggagcagatagtcatttaatgttaaatattccactgattatataat
ctagggtgctgttgggtgcatcaattgcaactgtaatttctgaaatgtctgtaactgtgtat
caactttttataattcataaacagcttaatttgcatacactgttttcggatttatctaag
tatttaattgcaggattagtgatgtttctaattgtcttttaaaattagttttgtaaacccg
acatcttgatattcattctgttggaaattactgtgggcataaattattatgttggttta
ttaatatttttaaggcagaaataaataaaactaaagtttattatgcataaaatagagg
tatggatttaggtacctgcctttaggatttttaattcaaaggatttaggtacttatggtt
actttaattcgattgtgacctactttattcttttggcaactttagggtgtgtaactatg
gtactaaagagatttcaggacatcgaaaggatattcgtaaaaatttctggggattttata
ccctccaattgatgagactattttgtctcttctgtctgtatatacatcattatgtttgttct
ttcctgggatgcaaaaataggtggcttatatacttaggattaagcttgatatacgaaggaa
tggatatttcttgggtattccaagggttggaggattttcgtcgtattaccgcaagggaata
caacggtaagggttttaggagttatttctatcttctattttgtgaaaacacctgggtatt
tgtatctctatgttttctattgaccttctttgaaattgcttgggcaattaagtataggt
taccagcagaccttacattggaaaaccacaatttgatttatcctatgctaagaaacatc

ES 2 610 811 T3

ttaaacctgttatTTTTGCTGTTTCTCCCTCAGGTTGCCATTTCACTATACGTGACTTTGG
ATCGTACAATGTTGGGTGCCTTGT CATCGACAAATGATGTAGGGATTTATGATCAGGCTT
TGAATAATAATTTTTGTTGACGTTGGTGACTTCATTGGGAAGTGAATGCTTCAA
GGTATCTGGTCTTTTATCTAACGGAGATCATAAGGCCGTTAACAAGATGCATGAATCT
CTTCTTGATTTATAATCTGTGATTTCCCGATAATAGCAGGTCTCTTGATTTGTAATA
AGGATTTTGTGAGTTTCTTACTAGGGAAGATTTCCAAGAGGCTTATCTTGCCATTGCTA
TTATGGTCTTTAGGATGTTCTTTATCGGTTGGACAAATATTATGGGAATCCAGATTTTGA
TTCCATATAATAAACATCGTGAGTTCATGCTCTCTACGACTATCCGGCTGTTGTCAGTG
TTGGACTTAATCTCTGTTAATTTCTCCATTTGGCTTTGTTGGGGTCTCAATGTATCA
GTTTTAACAGAGGCTTTGGTATGGGTTATTCAATGAATTTTCAAGGATATTCATCAA
GATGTGCAATCTTCCAGCCATATCAAAAATTATCTTAGCATCAGTTGT CATGTATCTT
GGACTCTTGTCTTTAAGATGTTTGTGCAATTGAAACCAATGCTAAATGTAGCAGTAGAT
GGTCTTGTGGTGCTATCATTTATATTGCTTGTGATTATTGCTTACGTGTCGTTGATATG
AAAGACTTGAAGCAACAGTTAATGAAAACTAAGGAGAAAAATATGTACGATTATCTTAT
CGTTGGTGCTGGTTTGTCCGGAGCAATCTTCGCACATGAAGCTACAAAACGTGGCAAAAA
AGTAAAAGTGATTGACAAGCGTGATCACATGGTGGCAATATCTACTGTGAAGATGTTGA
AGGTATTAATGTTCAAGTATGGTGCTCACATTTCCATACCTCAAATAAAAAAGTTTGT
GGATTATGTCAACCAATTTGCTGAATTTAATAACTATATCAACTCACCAATTTGCTAACTA
CAAGGGCAGTCTTTATAACCTTCCATTTAACATGAATACATTTTATGCTATGTGGGGCAC
TAAGACTCTCAAGAAGTTAAGGACAAGATTGCTGAACAAACGGCTGATATGAAAGATGT
TGAGCCTCAAAAACCTTGAAGAACAAGCTACAAGTTGATTGGACCAGATCTACGAAAA
TGTGATCAAGGGATACACTGAAAAACAATGGGGACGTTCTGCCACAGACCTGCCTCTTT
CATCATCAAGCGTCTTCCGGTTCGTCTAACTTTTGATAACAACACTTTAATGACCGTTA
CCAAGGAATCCGATCGGTGGTTACAATGTCATCATTGAAAAATGCTTGGAGATGTAGA
AGTAGAGCTTGGAGTTGACTTCTTTGCCAATCGTGAAGAGCTTGAAGCTCAGCTGAAAA
AGTTGCTTTACAGGAATGATTGACCAGTACTTTGATTATAACATGGTGAGTTGGAGTA
TCGCAGTCTTGGTTTGAACACGAAGTCTTGGATGAAGAAAATCATCAAGGAAATGCCGT
GGTCAACTACACAGAGCGTGAGATTCTTATACTCGTATCATTGAGCATAAGCACTTCGA
GTATGGTACACAACCTAAGACAGTTATCACACGTGAATACCCAGCTGATTGGAAACGTGG
AGATGAACCATACTACCCAATCAATGATGAAAAGAACAATGCCATGTTTGTCAAGTACCA
AGAAGAAGCTGAGAAAAATGACAAGGTATCTTCTGTGGACGTCTTGCAAGATTATAAATA
CTACGACATGCACGTGGTCATTGAGCGTGCTCTAGAAGTCGTTGAGAAAGAATTTATTTA
ATAAATAATGGCTCTTTGTCAACTGTAGTGGGTGACGAAAAGCTAACATCTAGAGAGGAC
CGGATAGGTCTCTTTTATGTATGTTCAAGTGTGATGAAGACACGTTTCTTAAAGTTGAT
GAAGTTTCTAAAACCGAAGCCCAACCGTTTGTGTTGATCAACTTATTAGTCGCTTC
AAGTTTTCGCTTGGATAGTCCGTTTCTAGTGCCTTTTGTGATTGCTTGTGCTAAG
AAAAGTCTAAAGACAGTTGAAAAATAGTGATTGACCTTGCTCTATTTCTCTATCAG
GTCAAAGAACTCATCTACTCTTCTCTCGAAAGTGAAAAAGCAAAAGCTGATAAAGTGT
ATAGTAGTCAGTAAGCTCTTTGAAAAGACTAGTGTCTTCGCAACAACCTCATGTGGTGC
TAAAGTTTGGCGGAAAGTCTTTGAATAAAAAGAATTGAGAGATAGTTTACAGCTGCTCTT
TTGGAAGAGTCGCCAGTGATTTTCAAGGCTCGATAGGGTAGTGACTTCTTATCGAATTA
GTTCATGATTGCAATTTAGTCTTTAAAAATGCTCTACCAAGGTGCTGGATGATGTGGAA
ACGATCAAGAACGATTTTTCGCTTGGAAAGAGTCTGCGGGCTAGTGGGATATAAGCTCC
AGACTTATCCATCGTGATAAAGTACCTGTTATCGGACTTCAATGGATACTTCAAAG
TAGTTTCTGATAGTAGTTTGGCGGCGATTATCAAGGATGGTTATGAGTTGGTTTGTCTCA
TAATCTGCGCCACAAAAGCCAATTTCCCTTTCTTGAACCCAAACTCATCCAGGACATA
ACAGCAGGGAGTTTGTCAATAATGTTTCTTGAAGTAAACTGATCAAGCTTACGATAGACA
GTGGACGTCGACACACGAAGTCTTCTTGCAATATCAGTTAGTGACACTTCTCAGTTAGG
AGTTGTGTAACCTTTTGTGGACTAGATTGGAGATTTGGTAGTTTTTCTCAACGATAGAT
GTCTCAGTACCGTGACTCTCTACAATTTTACACTGGAACGACGTTTTTTCAGACGT
AGTAGAGTTGGCGTCCCGCTTGTCTGAGAAGAGGGATTTTAGATTTTTTGAAGTCA
TATTTGATCATCTTCTTGGCAGTGAGGACATGATGGTGTAGGGTAATCAAGTTTTGCT
TGAATCTCGATATGAGTGTCAAGTTTCAAAAACAAGTGAATAATGATATTTTGGTCTTTA
ACTCCGATTAATCTGTGGTATTCTTAATAGGTCTCATAAGTCTTCTCCTAATGGTAGTTT
CGTCTCTTTTATTATAGTTCTTATGGGACTTTTTGTGTACACTCAAAAAGCTCTATAAT
CTCTACAGTGGTTTTACTCACTACAGAAATATAGAGCCAATATATCTCTGTCTATTTT
TATGCTACTTTTGGGTAGCTCAACTCAACCGCTTTTAACTCTCCAACAACAATAATAC
CCTATCAACAACCCAAAAAATCAAGATAATATCACTAATGGCAATGTGCCAAATAA
AAGATAAATGAAAGGTTTCAATCTCTAAAAGTGTGACCAAAGTGAATGACAAAGTGT
TTGAAATTAGTATTGATACAGTAAAGGCCACTAAGGAATGAAGTA

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DANISCO A/S

5 <120> BACTERIA

<130> P025948WO

10 <150> US 60/804.978
<151> 16-06-2006

<160> 24

15 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
<211> 37
<212> ADN
<213> *Streptococcus thermophilus*

20 <400> 1
actatgtggg tataaaaaca tcaaattc attgag 37

25 <210> 2
<211> 30
<212> ADN
<213> *Streptococcus thermophilus*

30 <400> 2
aatatctaca ggtcactaca aagctacgct 30

35 <210> 3
<211> 30
<212> ADN
<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 3
gttggggtgt gttgtaacg gcgtatgcta 30

40 <210> 4
<211> 30
<212> ADN
<213> *Streptococcus thermophilus*

45 <400> 4
tcaatcaggt gacggtgatg cttatattaa 30

50 <210> 5
<211> 30
<212> ADN
<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 5
catacatgat agtttgtaa cactttgat 30

55 <210> 6
<211> 30
<212> ADN
<213> *Streptococcus thermophilus*

60 <400> 6
tcagcatttg gtttacatga cccacgtctg 30

65 <210> 7
<211> 30
<212> ADN

ES 2 610 811 T3

	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>	
	<400> 7	
5	caatcaacag gttgactga ttataacggt	30
	<210> 8	
	<211> 30	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>	
	<400> 8	
	tagctacaca tgaatttat tacaatggtg	30
	<210> 9	
15	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>	
	<400> 9	
20	ccgttctca aacgttaaat tccaaggtg	30
	<210> 10	
	<211> 30	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>	
	<400> 10	
	gctgcgatta tgacaatgct gtctgtaagg	30
30	<210> 11	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>	
35	<400> 11	
	gaagaatta ttaataaaga tggttctgct	30
	<210> 12	
	<211> 30	
40	<212> ADN	
	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>	
	<400> 12	
45	aggcagaaaa gaagtattt ggtaagtatg	30
	<210> 13	
	<211> 29	
	<212> ADN	
50	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>	
	<400> 13	
	aaatggttta tcgacaagaa aatgaagct	29
	<210> 14	
55	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>	
	<400> 14	
60	ccaaattgc attatacaaa acgctccttc	30
	<210> 15	
	<211> 30	
	<212> ADN	
65	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>	

ES 2 610 811 T3

<400> 15
 atcctaactg cttgctaac tacatcatgg 30

5 <210> 16
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

10 <400> 16
 atcctaactg cttgctgac tacatcatgg 30

15 <210> 17
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

20 <400> 17
 taacaagata agattagtcg tcttctacat 30

25 <210> 18
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

30 <400> 18
 ttgattcaac ataaaaagcc agtcaattg aactggctt t 41

<210> 19
 <211> 1169
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 19

ES 2 610 811 T3

```

actatgtggg tataaaaaaca tcaaaaatttc atttgagggtt tttgtactct caagatttaa      60
gtaactgtac aacaatatct acaggtcact acaaagctac gctgtttttg tactctcaag      120
atttaagtaa ctgtacaacg ttgggggtgtg tttgtaacgg cgtatgctag tttttgtact      180
ctcaagattt aagtaactgt acaactcaat cagggtgacgg tgatgcttat attagtttt      240
tgtactctca agatttaagt aactgtacaa ccatacatga tagtttgcca acacttttga      300

tgtttttgta ctctcaagat ttaagtaact gtacaactca gcatttggtt tacatgaccc      360
acgtctgggt tttgtactct caagatttaa gtaactgtac aaccaatcaa caggtttgac      420
tgattataac ggtgtttttg tactctcaag atttaagtaa ctgtacaact agctacacat      480
gaattttatt acaatgggtg tttttgtact ctcaagattt aagtaactgt acaaccggtt      540
cttcaaacgt taaattcaa ggtgtgtttt tgtactctca agatttaagt aactgtacaa      600
cgctgcgatt atgacaatgc tgtctgtaag ggtttttgta ctctcaagat ttaagtaact      660
gtacaacgaa gaatttatta ataaagatgg ttctgctggt tttgtactct caagatttaa      720
gtaactgtac aacaggcaga aaagaagtat tttggtaagt atggtttttg tactctcaag      780
atttaagtaa ctgtacaaca aatggtttat cgacaagaaa atgaagctgt ttttgtactc      840
tcaagattta agtaactgta caaccctaat ttgcattata caaacgctc cttcgttttt      900
gtactctcaa gatttaagta actgtacaac atcctaactg ctttgctaac tacatcatgg      960
gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacatcc taactgcttt gctgactaca     1020
tcatgggttt ttgtactctc aagatttaag taactgtaca actaacaaga taagattagt     1080
cgtcttctac atgtttttgt actctcaaga ttaagtaac tgtacagttt gattcaacat     1140
aaaaagccag ttcaattgaa cttggcttt                                     1169

```

<210> 20

<211> 17387

5 <212> ADN

<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 20

ES 2 610 811 T3

gctgagccag cttactagcg tacaggcacc tactaagggt gataagaaca atatcgaggt 60
cttgatgtca gctctcaaaa aagataaaaa agttgatggt aaagttgatg atggttgcttc 120
atatcaagaa gcttatgata atctcaagtc tggcaaatct aaagctatgg tcttgagtgg 180
ctcttatgct agcctattag agtctgtcaa tagtaacctt gcttcaaatc taaaaacaat 240
ttatacttat aaaattaaaa agaagaataa caactctgca aaccaagtag attcaaaaagt 300
cttcaatatt tatattagtg gtattgatac ctacggttcg atttcaacag tgtcacgctc 360
agatgtcaat attattatga cagtaaacad gaatacacat aagattctct tgacgactac 420
tccacgtgat gcatacgta agattcctgg tgggtgggca aaccagtatg ataaattaac 480
ccacgcaggt atttatggtg ttgaaacatc tgaacaaact ctggaagatc tatatggtac 540
taagattgat tactatgcac gaattaactt cacatctttc ctttaagttga ttgaccaact 600
tgggtggtg acagtcata atgatcaagc tttcacaagt cttcatggga agtttgattt 660
cccagttgga gatatccaaa tgaattcaga gcaagcactt ggatttgctc gtgaacgcta 720
tagtttagat ggcggagata atgaccgtgg taaaaccag gagaaagtca tttctgcgat 780

ES 2 610 811 T3

tgtaaacaag ttggcttctc taaagtctgt atcaaaacttt acttcaatcg ttaataatct 840
 ccaagactct gttcagacaa atatttcttt ggataccatt aatgctttgg ctaatacaca 900
 acttgattca ggctctaaat ttacagtaac gtctcaagca gtaactggta caggttcaac 960
 cggacaattg acctcttatg cgatgccaaa ttctagtctt tacatgatga aactagataa 1020
 ttcgagtggt gcaagtgcct ctcaagctat caaaaactctg atggaggaaa aataagtgat 1080
 tgacgttcac tcacatattg tttttgatgt tgatgatggg cctaaaactt tagaagaaag 1140
 tttagacctc attggtgaaa gttatgccca gggggtacgt aagattgttt caacatccca 1200
 tcgtcgtaag gggatgtttg agactccaga ggataaaatt tttgccaact tttctaaggt 1260
 aaaagcagaa gcagaagcac tttatccaga cttaactatt tattatggag gtgaacttta 1320
 ttacacctca gacattgtgg agaaacttga aaagaatctc attccgcgca tgcacaacac 1380
 tcaatttgct ttgattgagt ttagtgctcg cacatcttgg aaagaaattc atagtgggct 1440
 tagtaatgtt ttgagagcgg gggtaacgcc tattgttgct catattgagc gctatgatgc 1500
 cctcgaagaa aatgctgatc gtgtagaga aattatcaat atgggctgct atactcaagt 1560
 caatagctca catgtcctca aaccaaagct ctttgagat aaagaaaaag taagaaagaa 1620
 acgtgttcgc tttttcttgg agaaaaattt gttcatatg gttgctagcg acatgcataa 1680
 tcttgggccc agaccacat ttatgaaaga tgcttatgaa attgttaaaa agaactacgg 1740
 ctccaaacgt gctaagaatc tttttattga aaatcccaaa acattactag aaaatcaata 1800
 tttataggag atattatgaa tcaagataac actaaaagtg atgaaatcga cgtactagca 1860
 ttgctacata aactttggac gaagaagctt ttgattcttt tcacagcttt ttatttcgct 1920
 gctttcagtt tcttaggtac ttatttcttt atccaaccaa catatacatc aacaacgctt 1980
 atctatgttg ttaatcaggc aacagataat aataatcttt ctgctcaaga tttgcaagct 2040
 ggtacctatt tggcaaatga ctataaagag attattacat caaatgatgt attatcagaa 2100
 gttattaaag atgaaaaatt gaatttgagt gaggcagaac tgtctaaaat ggtttcagtt 2160
 aatattccta ctgatactcg tcttatttca atttctgtta atgctaaaac tggcaagat 2220
 ggcgcaaacac ttgctaataa ggttcgtgaa gttgcttcaa aaaaaatcaa gaaggtgaca 2280
 aaagttgaag atttcacaat gctcgaagaa gctaaattgc cagagtcacc atcttcacca 2340
 aatatcaaac ttaatgtgct tcttggggca gtgcttgag gattccttgc agtggttggt 2400
 gtattggtac gtgaaatcct agatgatcgt gttcgccgtc cagaagatgt ggaagatgcc 2460
 cttggaatgg cacttcttgg aattgtccct gatacagata aaatttaagg agaagaaatg 2520
 cctctattaa agttagtaaa atctaaagta aactttgccca aacaaacaga agagtattac 2580
 aatgccattc gcacaaatat tcaattttct ggtgctcaga ttaaagtgat tgcgattagc 2640
 tctgttgaag ctggtgaagg aaaatcaacg acatctctta acttggcgat ttcatttgct 2700

ES 2 610 811 T3

agtgttgggc tccgaacact tctgattgat gctgatactc gtaattctgt tttttcaggt 2760
 acatttaaat caaatgagcc ttataaaggt ctttcaaatt ttctttcagg aaatgccgat 2820
 ctaaatgaaa cgatttgcca aactgatatt tctggtttgg atgttattgc atctggtcct 2880
 gttccaccta atccaacaag tcttttgcaa aatgacaatt ttagacattt gatggaagtt 2940
 gctcgtagtc gttatgatta tgtcatcadc gatacaccac cagttggttt ggttattgat 3000
 gcagttattt ttgeccatca ggctgatgcc agtccttttg ttacagcagc tgggaaaatc 3060
 aaacgctggt tcgtaactaa ggccgctgaa caattggaac aaagtgggtc tcagttctta 3120
 ggtgctgctc ttaataaagt tgacatgaca gttgataaat atggatcata tggttcttac 3180
 ggatcatatg gttcttacgg atcatatggt gagtacagga aaaaaacaga ccaaactgaa 3240
 ggtcattcaa gagcacatcg tcgtagaaaa ggatagcatt aatggggatg atgcccgtcc 3300
 ttataacctt acagattaaa aaggggttta gagtgaaaga aaaacaagaa attcgtcgca 3360
 ttgaaattgg tattatacag ttggttgtgg ttgttttcgc agccatggta gctagtaaaa 3420
 taccatatac agagattacc caaggaagta ttgtcctttt aggtgctgta catgtagtgt 3480
 cttactatat cagtagttat tatgaaaatc ttaagtatag aggctacttg gatgaaactca 3540
 ttgcaactgt caaatattgt ttcataattg ctctaattgc aacatttctc tcgttttttg 3600
 cagatggaag ttttcaatc tcacgtcgcg gacttcttta cgtcaccatg atttcagggtg 3660
 ttctcttata cgttacaaat actgttctta agtatttccg ctcatctatt tatacacgtc 3720
 gtaaaagtaa caagaatatt ctcttgattt ctgatcaggc acgtcttgat aatgttttgt 3780
 ctcgtagtaa agacaatatg gatggttaga ttacagcagt ttgtgtcttg gataatcctt 3840
 attttactga tccatttato aagagtgtta aacctgaaaa ttgattgaa tatgcgacac 3900
 actcagtagt agaccaagtt ttgattaatc tgccaagtgg gcagtataag atttgggatt 3960
 atgcatcacc ttttgagatc atgggaatc cagtttctat taatttgaat gcccttgaat 4020
 ttatgagtca aggtgaaaaa cgtattcaac aattgggtcc tttcaaagtt gttacgtttt 4080
 caacgcaatt ttatagctat ggagatatct tggcgaaacg ttcctcgtat atctgtggag 4140
 ccctagttgg tttggtgctc tgtgggattg ttggaatctt cctttatcca cttattcgta 4200
 aggatggtgg gccagccatt tttgctcaag accgtgtggg agaaaatgga cgtatcttta 4260
 agttttataa attccgttct atgtgtgttg atgcggaaga aatcaagaag aatttgatgg 4320
 cacagaatca aatgtctggt ggtatgttta agatggacaa tgatccacgt attaccaaaa 4380
 ttggacgttt cattcgtaaa acaagtcttg atgaacttcc acaattttgg aatgtcctaa 4440
 aaggtgatat gagcttggtt gggacacgtc ctccaacagt tgatgagtat gaaaaatata 4500
 cacctgaaca gaaacgtcgt ttaagtttta aacctggtat cactggctct tggcaagtaa 4560
 gcggtcgaag tgaattact gattttgatg aagttgtaaa actagacgtt gcttattttg 4620

ES 2 610 811 T3

acggatggac aatctggcgt gatatcaaaa tcttattgaa aācaattaāa gtagtagtaa 4680
 tgaaggatgg agcaaagtga tggctttcac ctttctttt aatggtgatt aaatgacaaa 4740
 aacagtttat atcgttggtt ctaaggggat tccagcaaaa tatggtggat ttgagacctt 4800
 tgttgagaag ttgacagagt tccaacaaga caaagatata caatattatg tagcttgtat 4860
 gcgggaaaac tctgcaaaat cagacattac agcagatgat tttcaaactt cgcaacagaa 4920
 ccctaaaaag aactccctaa cggtcgtggc tactttgttt agtctaaaca ctttgaatag 4980
 tcctacaagc tcatagtttc ccttttatta gttggtccaa ggccaattct attttttgaa 5040
 gcgaaagaat atggggagcg ccttccttat ttactgatat gtaaacctgg aattactggt 5100
 tattggacga cacatggtcg aagtaaagtt cttttcctc aacgagcaga tttagaactc 5160
 tattatctcc aatattacag caccaagaac gacatcaagc ttctaatacg tacaatttca 5220
 caaatcatta acggattgga cgcttactaa aaaattaatg aaaaaatatt tgaaatcata 5280
 actcgaaaaa tattaaaaga ttagatatgt atcataaaac cogaattgct agttaatttc 5340
 attgaaaaat aaataagtcg tgctatccta atcttaaacc actaagcatt agaaagcgca 5400
 cgacttatat gacttataat agcacacttc caaaagtttt tgtttatta ctgacaacca 5460
 ttgagacgct ttatcaaacg agtgttcccc ttgaggttca aaaccgaaag aacgtccatc 5520
 tcgcaacatc agattgctta gttatcgctt gttacctatg gggcgtactg catttttagtg 5580
 aaacgcttaa agcaaagcac caattggctc aaagtttatt tctaatttc ctagaatatt 5640
 ctcactttgt cgcgcttgt aatgccctct taccgagtat ccaagtcatt cgccaagcac 5700
 tcgtatttaa agaggttgaa ggaattagtg tatccattat tgacagcttc cccattcctt 5760
 tgtgtcagtc tattcgtaat ttcagaagca aagttcttgg agattatgca aatgttggct 5820
 acaatgctac aaagggacag tacttctatg gatgtaaagtg tcatgcttta gtcagtgaat 5880
 caggctatgt catagactac acaattactc ctgcttcaat ggctgatagt tcaatgaccg 5940
 aggaagtgtt gagtcaattt gggacaccaa cagtccttgg agatatggga ttttaggtc 6000
 agtcactgca tgataggctg gaattaaaag gaattgatct aattacacct gtcaggaaga 6060
 acatgaagca aaagaaaatt cttttcccta atttttcaaa acgtagaaaa gtgattgagc 6120
 gagttttctc ttttttgaca aatctaggag ctgagcgttg taaaagtcgt tcgcctcaag 6180
 gttttcaatt gaaattagag atgatacttt tagcgtattc tttactgtta aaatcagcta 6240
 aatcactgga accagagact ttaagatatt ctatcgggta tcaagtcatg gctaaataat 6300
 caactagcaa ttcgggtatc ataaaggagt gatttaatga aaaaaattac aatagcagtt 6360
 gcaacgcata aaaaaatca aatgccaaaa gataatattt atctaccaat tgaatgtgga 6420
 gcagttttae gaaaaaatca cctagactat attgctgatg atagtggaga taatatttct 6480
 gaaaaaaaca agaattattc agagttaaca gcactatatt ggttatggaa aaataatgat 6540

ES 2 610 811 T3

tctgagtata aaggattagc acactataga cgtcāttttt cāgataaaaa ggtgagtatt 6600
 ttttctacag gtaattttga taatatactt gataggacgg tacttgagga acatttagag 6660
 aagtttgata ttatacttcc caagcttoga cactactata ttgaaacaat agaatctcac 6720
 tataaacata cgcattttga aaaagattta ttagcaacag aagaaataat taaaaaacta 6780
 tctcctgact atcttgattt ttattatagt gcactaaaaa gaaaatctgc tcatatgttt 6840
 aatatgttta ttatgaaaga taaatatttc aataattatt gtgaatggtt attttcgatt 6900
 ctttttgaat tagaaaaagt actagatatt tcagaatatt ctccctttca tgcaagagta 6960
 tttggtcgtg tgagtgaaat tttattagat gtatggattt tcaagaataa tttaaatttc 7020
 actgaaattc cagttatggt tatggaaaag caaaattggt gggataaatc taaaagattt 7080
 atttctgcaa agcttttcaa caaaaaatat tattagacta ggagaaataa attgcttaca 7140
 atcggaataa ttttaataat ttttatgact attttcgatt attatataca taaaacagta 7200
 ttttctccgg tctttatggt taattcactc tttttattaa taatatctct ttcttctatg 7260
 aggttatata atttgagaga atattctatc aaatcaatag aagtaattgt gttagggatg 7320
 atattcttct ctttaggagt attttgact cgtattgttt ctcatgaatt tttaaaaaat 7380
 caaaataatg ttattaatta cgatgataat ttaaattgaa attggacttt tttaaaaatt 7440
 cttttgatag ttgtaaccac aggaaacgta ttctctatta ttttttctt gaaattcctt 7500
 ttagggaggag gttcatactt agaattgaga aatatgatat tgggatataa tggagctgaa 7560
 ccacttatta cgaatcctct cgtaaatata ttaacaagat atatatcggg accaggggtg 7620
 actgcttga tcccattttc tttttttttt ctaattagga aaaaaaacat taaattttcc 7680
 ttaattattt tattgaatct tgttttgcca acattatcat ccggtggtag aattttactt 7740
 gtatatacta ttattcaatt gtttatagga ttatcttatt caaaaaaaaa tataccaaaa 7800
 aaaattaaga aagtagtcat aatatcaagt attatatttt ttatatctat aattgtctta 7860
 tctaacatca gaagttctaa cagtatatat agagcgtttt atgcatactt ttcgggcctt 7920
 gtagttcttt tatctacttg gatgactgat gttgatactt ataatttca ttcacatgga 7980
 ttaggattta tttatcccat cacatatcta ttaaattcat tttgtaattt aataggaatt 8040
 cctaaactga tgttggtctaa tgttgcctatg tggcaaggaa tgcctcagaa tgattgggta 8100
 ggcgtattcc ctaatcaatc gatgaacgct tttagtacac ttttctattt tttctataaa 8160
 gattttcgag aatttgaggt tgcttgcttt tctttccttt ttgggagat tttgtgtttt 8220
 atttatttta aagcgtttat cgaaagaaaa agtaaatac tagtctatta tttattaggg 8280
 gtacaggcaa ttatcggatc ttttattatt tggcaattgg ggagtactgc gtttttctta 8340
 agtattgtat ttacaatatt aagtctgaaa tcaaagaaat cataactata gaaaaggaga 8400
 taaaatatga caatcagcat agtaatccca gtttataatg ttcaagatta cataaaaaag 8460

ES 2 610 811 T3

tgtctagatt ctatattaag ccagacattt tcagatttag aaattattct tgttgatgat 8520
 ggttctactg acttgagtg gagaatttgt gattattatt ccgaaaatga taaacgtatt 8580
 aaagtaatcc acacagcaaa tgggggacag tcggaagcaa ggaacggttg aatcaaaaat 8640
 gccacatcag aatggataac atttattgat tctgatgact acgtttcttc tgattatata 8700
 gagtatttat ataatttgat tcaagtacac aatgcagata tttcaatagc tagttttacc 8760
 tatatcacac ctaaaaagat aattaagcac ggtaacggtg aagtagctct tatggatgca 8820
 aaaactgcaa ttcggagaat gttactgaat gaaggtttcg atatgggagt ttgggggaaa 8880
 atgtatcgaa cggagtattt taataaatat aaattcgttt caggaaaact atttgaagat 8940
 tctttaatta cataccagat attttcagaa gcttcaacaa ttgtttttgg agcaaaggat 9000
 atttattttt atgttaacag gaaaaattct actgttaatg gtacttttaa tataaaaaag 9060
 tttgatctta ttgaaatgaa tgaagaagca aataagtta ttaaacataa atttccagat 9120
 ctttcatctg aagcacatcg tcgaatgata tgggcatatt ttagtacct aaatcaagtt 9180
 ttatcatcaa ctaatgaaca cgatattgat ttatatgccc cacaattagt agcttatctc 9240
 cttaaacagg ataaattcat aaaaaggaat acttttattc ccaaaagaga taagattgca 9300
 ttttttattt taaaaaattt tggtttaaag acatatcgta atgtttggaa tttatattta 9360
 aaaatgacaa gataaaaaca ataatgaaag ataaaaata atgaaaactg ctacaattac 9420
 tttacattca gcacataata atggatctat cttttctaca gtcatttgct ttgcagagaa 9480
 agataatatic tatgggatat gataacgaaa ttataaatta tattccactc aaattgctcg 9540
 tagttttaag aaccaagtgc aaaagattat taaggttaac aacgttacga ttgttgctac 9600
 ggccgcaacg ccgaagaagc cgctgaatac gttgattggg ctagttgtcg gcttgctata 9660
 ggatttgttt atgcagcgat tcggatgctc acggatcgcc gcgttcacga agctgatttc 9720
 ttaactgatg aattaggatt gactagttta ggcttggtta accatcaaca tcaccattca 9780
 atgaagaaac aggccttgaa tctgaacggt ggctatcata cgcataacga tcaaactct 9840
 tcacaagcga tgaaacgagt ttaggaggtt gctagatgtt taaacgtaaa gaaaagaata 9900
 taacgactac ggcaccaatt aatctacca cgattaatga acccatgtcg gtcattactg 9960
 agcagattaa aacaattcga accaatatca attttgcggc tactgaccat aagctacgaa 10020
 ctttgatggt gacttcggcc atgottggcg agggtaaate gacagtaagt ggtaacttag 10080
 cagtggagta tgccaaggaa ggaaggcaag caagtcttac tggtcgatgc tgacttgcca 10140
 cgaccaacga ttcataagac atttggcctt aaaaaccata agggattaag ttcattggta 10200
 gccaatcaga ttgacgatgt gaatgatgca attcatcccg tcattggcaa tctataattg 10260
 tataaatagt atgtatactt tataacaatg gagtgtttta atgaatcttt tgtttagtca 10320
 atgtcacatt acattgaaaa tttaaaaaat gtaacttttt tgcgttgtaa tagctatgta 10380

ES 2 610 811 T3

caatgatttt ctgggtggca gactaatcaa gtataaaata gcttatacta gttgacaaca 10440
 tcccgtgata attattaact tatcaagtac aggccaaaat actggagcctt aacaggaact 10500
 gttagaatat gattttatat aattaggagt agaataaaga gatgaatcca ttaatataca 10560
 ttattgttcc aacatataat gttgaaaaat atattaggac atgtattgaa tcaatccttag 10620
 ctcaaacata tcgcaatatt gaagtcatta tagtaaatga tggtagcaca gatcagtcgc 10680
 tagcagtaat ttccgattta atctgtagtc atcataatat taaggtaatc aaccaaaaaa 10740
 accaaggatt atcagtagct cgaaacactg gtattgatgc ggcaactggt aatatatag 10800
 cttttgtaga tgcagatgac aaaattaagc cagactttgt tagctcgcctc tatcaaattg 10860
 ctgacaaaac aggagctgac attgtgcgtg ggtcatttcg agactttaat ggcaatattc 10920
 ctaaaggctg ggttccagat ttcaatgttc caaccaatta tgggacaata gtattagacc 10980
 aattcttate cagcaacata tctttttag tttggctcgag tatctatagg ctagatttta 11040
 ttaatagtaa tcatatacga ttacaccag ggattctatt tgaggatgca gattttacaa 11100
 taagagctta tatgctcgtc aagttagttg ctacatcacc tgaaccaa at tatgcatata 11160
 gaataaatcg tccaggaagt atattaacca caaaaaccac aaaaaatgcc caaaaaatgt 11220
 ctcttcaga agaaaaaatt atatcacaat ttattagtat gttaaagcat gaaaaatctg 11280
 atgtttatg tagtttaatt ctaaagtcta tttatgcatg tatgagagat tggacgggaa 11340
 ttattgtgag gaataacctc tcgttggata ggaagaacag ttgttttgat actgctctca 11400
 ctctaataaa agaaataata aattctaggc ccttaaaaga aaaaatcaaa tttttaacaa 11460
 aggttattat tattaaggcg aaaaccatt aagccgttaa acgaaaatcc aaagggttca 11520
 tatacaatta tgtaattat ggatttttta tatcttcaat gggttcatta atcactgaat 11580
 ttgattatct tgttttaatg aatgtgaagt catteggtta aggggagtct ttgatttgc 11640
 tagttagcta tctggacaga tgtaagtgt taattacagt gaaggcagat gaaaacttat 11700
 taaaagttat tctgcttgat taagaatggt aagatttcac catctatata cttttattag 11760
 aacttaggtg gacaggagga cccaattttt aatccttctt gttatatagt ttttgtttaa 11820
 tatttttcgg gaggattatt aatgcaaata gtaaaaaatt atctttataa tgcaatgat 11880
 caggtcttta taattattgt gccattactt accattcctt atttgtcaag aattttgggc 11940
 ccttcaggta ttggaattaa ctcatatacc aattctattg ttcagtattt tgttttattt 12000
 ggtagtatag gagtcggttt gtatgggaat cgtcagattg cctttgttag ggataatcag 12060
 gtcaaaaatg ctaaagtctt ttatgaaata tttattttta gactattaac aatatgttta 12120
 gcatatttat tgttcgttgc ttttttaacc attaatggtc agtatcatga atactatttg 12180
 tttcaatcca ttgctatagt tgcagctgca tttgatatct cttggttttt tatgggaatt 12240
 gaaaaattta aagtaactgt attaagaaat tttatagttc agttacttgc tctattcagt 12300

ES 2 610 811 T3

attttccctat ttgtcaaate ttacaatgat ttgaatatat atatattgat aacagtttta 12360
 tctacattaa ttggtaattt aacttttttc ccaagtttac acagatatct cgtaaagggtt 12420
 aactatcgtg aattaaggcc aataaagcat ttaaagcaat ctttagttat gtttatccca 12480
 caaattgctg tccaaattta ttgggttttg aataaaacaa tgtaggttc attggattct 12540
 gtcacgagct ccggcttttt tgatcagtct gataaaatag ttaaactggt tttggctatt 12600
 gctagtgcaa caggtactgt catgttgcca cgtgttgcaa atgcctttgc acatagagag 12660
 tatagtaaaa ttaaggagta catgtacgca ggtttttctt ttgtgtcggc aatttcgatt 12720
 cctatgatgt ttggtctgat agctattact cctaaattcg tgccactttt ttttacatct 12780
 caatttagtg atgttattcc tgtgttaatg atcgagtcaa ttgcaattat ttttatagct 12840
 tggagcaacg caataggtaa tcaatatctt ttaccaacta atcaaaaataa gtcataata 12900
 gtgtcgggtg tcatgggagc gatagtcaat ttaatgttaa atattccact gattatatat 12960
 ctagggtcgt ttggtgcac aattgcaact gtaatttctg aaatgtctgt aactgtgtat 13020
 caacttttta taattcataa acagcttaat ttgcatacac tgttttcgga tttatctaag 13080
 tattaattg caggattagt gatgtttcta atgttcttta aaattagttt gttaacaccg 13140
 acatcttggg tattcattct gttggaatt actgtgggca taattattta tgttgtttta 13200
 ttaatatttt taaaggcaga aataattaat aaactaaagt ttattatgca taaatagagg 13260
 tatggattta ggtacctgcc tttaggattt ttaattcaaa ggatttaggt acttatgggt 13320
 actttaattc gattgtgacc tactttattc ttttggcaac tttagggtgt gctaactatg 13380
 gtactaaaga gatttcagga catcgaaagg atattcgtaa aaatttctgg ggtatttata 13440
 ccctccaatt gattgcgact atttgtctc ttgtcttgta tacatcatta tgtttgttct 13500
 ttctcggat gcaaaatag gtggcttata tcttaggatt aagcttgata tcgaaaggaa 13560
 tggatatttc ttggttattc caaggtttg aggattttcg tcgtattacc gcaaggaata 13620
 caacgtaaa ggttttagga gttatttcta tcttctatt tgtgaaaaca cctgggtgatt 13680
 tgtatctcta tgttttcta ttgacctct ttgaattgct tgggcaatta agtatatggt 13740
 taccagcgag accttacatt ggaaaaccac aatttgatt atcctatgct aagaaacatc 13800
 ttaaactgt tattttgctg tttctcctc aggttgccat ttactatac gtgactttgg 13860
 atcgtacaat gttgggtgcc ttgtcatcga caaatgatgt agggatttat gatcaggctt 13920
 tgaaaataat taatattttg ttgacgttg tgacttcatt ggaagtgt atgcttccaa 13980
 .gggtatctgg tcttttatct aacggagatc ataaggccgt taacaagatg catgaattct 14040
 ctttcttgat ttataatctt gtgattttcc cgataatagc aggtctcttg attgttaata 14100
 aggattttgt gagtttctta ctagggaaag attccaaga ggcttatctt gccattgcta 14160
 ttatggtctt taggatgttc tttatcggtt ggacaaatat tatgggaatc cagattttga 14220

ES 2 610 811 T3

ttccatataa taaacatcgt gagttcatgc tctctacgac tattccggct gttgtcagtg 14280
 ttggacttaa tctcttgta atttctcca tttggctttg ttgggtctc aattgtatca 14340
 gttttaacag aggccttggg atgggttatt caattgaatt tttcaaggat attcatcaaa 14400
 gatgtgtcaa tecttccagc catatcaaaa attatcttag catcagttgt catgtatctt 14460
 ggactctttg tctttaagat gtttgtgcaa ttgaaaccaa tgctaaatgt agcagtagat 14520
 ggtcttgtcg gtgctatcat ttatattgtc ttgattattg tcttacgtgt cgttgatag 14580
 aaagacttga agcaacagtt aatgaaaaac taaggagaaa aatatgtacg attatcttat 14640
 cgttgggtgct ggtttgcg gagcaatctt cgcacatgaa gctacaaaac gtggcaaaaa 14700
 agtaaaagtg attgacaagc gtgatcacat tgggtggcaat atctactgtg aagatgttga 14760
 aggtattaat gttcacaagt atgggtgctca cattttccat acctcaaata aaaaagtttg 14820
 ggattatgtc aaccaatttg ctgaatttaa taactatata aactaccaa ttgctaacta 14880
 caagggcagt ctttataacc ttccatttaa catgaataca ttttatgcta tgtggggcac 14940
 taagactcct caagaagtta aggacaagat tgctgaacaa acggctgata tgaaagatgt 15000
 tgagcctaaa aacttgaag aacaagctat caagttgatt ggaccagata tctacgaaaa 15060
 gttgatcaag ggatacactg aaaacaatg gggacgttct gccacagacc tgctccttt 15120
 catcatcaag cgtcttccgg ttcgtctaac ttttgataac aactacttta atgaccgtta 15180
 ccaaggaatt ccgatcggg gttacaatgt catcattgaa aatatgcttg gagatgtaga 15240
 agtagagctt ggagttgact tctttgcaa tcgtgaagag cttgaagctt cagctgaaaa 15300
 agttgtcttt acaggaatga ttgaccagta ctttgattat aaacatggg agttggagta 15360
 tcgcagtctt cgttttgaac acgaagtctt ggatgaagaa aatcatcaag gaaatgccgt 15420
 ggtcaactac acagagcgtg agattcctta tactcgtatc attgagcata agcacttcga 15480
 gtatggtaca caacctaaga cagttatcac acgtgaatac ccagctgatt ggaaacgtgg 15540
 agatgaacca tactacccaa tcaatgatga aaagaacaat gccatgtttg ctaagtacca 15600
 agaagaagct gagaaaaatg acaaggttat cttctgtgga cgtcttgcag attataaata 15660
 ctacgacatg cacgtggtca ttgagcgtgc tctagaagtc gttgagaaag aatttattta 15720
 ataaataatg gctctttgtc aactgtagtg ggtgacgaaa agctaacatc tagagaggac 15780
 cggataggtc ctctttttat gtatgttcag tgtgatgaag acacgtttct taaagttgat 15840
 gaagtttcta aaaccgaagc ccaaccgttt gatgtctttg atcaacttat tagtcgcttc 15900
 aagttttgcg tttggatagt ccgtttctag tgcgtttttg atgtattgct tgtgtctaag 15960
 aaaagtccta aagacagttt gaaaatagtg attgacctg ctctatctt cctctatcag 16020
 gtcaaaagac tcatctactc tcttctctg aaagtgaaaa agcaaaagct gataaagtgt 16080
 atagtagtca gtaagctctt ttgaaaagac tagtgtcttc gcaacaactt catgtggtgc 16140

ES 2 610 811 T3

taaagtttgg cggaaagtct ttgaataaaa agaattgaga gatagtttac agctgtcctt 16200
 ttggaagagt cgccagtgat ttttcaaggc tcgatagggt agtgacttct tatcgaatta 16260
 gttcatgatt gcaattctag tctttaaaaa tgctctacca aggtgctgga tgatgtggaa 16320
 acgatcaaga acgatttttg cgtttgaaa gagtctgagg gctagtggga tataagctcc 16380
 agacttatcc atcgtgataa actgtacctg ttatcggact ttcaatggat acttcaaaaag 16440
 tagtttcgta tagtagtttg gcggcgatta tcaaggatgg ttatgagttg gtttgtctca 16500
 taattctgcg ccacaaaagc caattcccct ttcttgaacc caaactcatc ccaggacata 16560
 acagcagggg gtttgtcata atgtttcttg aaagtaaact gatcaagctt acgatagaca 16620
 gtggacgtcg acacacgaag tcttcttgca atatcagtta gtgacacctt ctcagttagg 16680
 agttgtgtaa ctttttggtg gactagattg gagatttggg agtttttctc aacgatagat 16740
 gtctcagcta ccgtagctct cctacaattt ttacactgga aacgacgttt ttcagacgt 16800
 agtagagttg gcgttcccgc ttgctcgaga agagggattt tagatttttt ttgaaagtca 16860
 tatttgatca tctttctttg gcagtgagga catgatggtg tagggtaatc aagttttgct 16920
 tgaatctcga tatgagtgtc agtttcaaaa acaagtgaaa taatgatatt ttggtcttta 16980
 actccgatta attctgtggt attcttaata ggtctcataa gttcttctca atggtagttt 17040
 cgtcgtttt cattatagtt cttatgggac tttttgtgta cactcaaaaa gctctataat 17100
 ctctacagtg gttttactca ctacagaaat tatagagcca atatatctcc tgtctatttt 17160
 tatgctactt ttgggttagc tcaactcaac cgctttttaa tctcccaaca acaataatac 17220
 cctatcaaac aacccaaaaa attcaagata atatcactaa tggcaaatgt gcccaataa 17280
 aagataaatt gaatggtttc aattcctaaa agtgtgacca aactgataat gacaaactgt 17340
 ttgaaattag tattgatata gtaaaggcca cctaaaggaa tgaagta 17387

<210> 21
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

5

<400> 21

caaggacagt tattgatttt ataactacta tgtgggtata aaaacgtcaa aatttcattt 60

gag 63

10

<210> 22
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

15

<400> 22
 ttgattcaac ataaaaagcc agttcaattg aactggctt t 41

20

<210> 23
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 610 811 T3

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico

5 <400> 23
aaatgaattc agagcaagca cttg 24

10 <210> 24
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico

<400> 24
gtcatgtcaa ctttattaag gacg 24

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria acidoláctica de *Streptococcus thermophilus* de acidificación rápida que genera una viscosidad en la leche fermentada superior a 62 pascales-segundos (Pa.s) después de 14 días de almacenamiento a 6 °C, en la que dicha bacteria comprende la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 19 o un homólogo de la misma con al menos 90 % de identidad con la misma, o un fragmento de SEQ ID N.º 19 que comprende al menos 90 % de la secuencia SEQ ID N.º 19 y en la que dicha bacteria comprende la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 20 o un homólogo de la misma con al menos 99 % de identidad con la misma.
2. La bacteria acidoláctica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha bacteria es resistente a fagos.
3. La bacteria acidoláctica de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que dicha *Streptococcus thermophilus* genera una viscosidad en la leche fermentada superior a 65 Pa.s después de 14 días de almacenamiento a 6 °C.
4. La bacteria acidoláctica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha bacteria comprende la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 20.
5. Una cepa de *Streptococcus thermophilus* aislada depositada en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D - 38124 Braunschweig) con el número de depósito 18344 el 14 de junio de 2006, o un mutante de la misma, en la que dicho mutante de la misma genera una viscosidad en la leche fermentada superior a 62 pascales-segundo (Pa.s) después de 14 días de almacenamiento a 6 °C.
6. Una cepa de *Streptococcus thermophilus* aislada de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el mutante de la misma comprende la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 19 o un homólogo de la misma con al menos 90 % de identidad con la misma, o un fragmento de SEQ ID N.º 19 que comprende al menos 90 % de la secuencia de SEQ ID N.º 19.
7. Una cepa de *Streptococcus thermophilus* aislada de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicho mutante de la misma comprende la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 20 o un homólogo de la misma con al menos 99 % de identidad con la misma.
8. Un cultivo celular que comprende la bacteria acidoláctica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la cepa de acuerdo con una o cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en el que dicho cultivo celular es un cultivo iniciador, un cultivo probiótico o un complemento dietético.
9. Un cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 8 en el que el cultivo iniciador es un cultivo mixto.
10. Un cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en el que el cultivo iniciador comprende una o más bacterias acidolácticas seleccionadas de las especies que consisten en *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y/o *Bifidobacterium*.
11. Un cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-9 en el que el cultivo iniciador es un cultivo iniciador deshidratado o un cultivo iniciador congelado.
12. Un alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico que comprende la bacteria acidoláctica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, la cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, o el cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-11 y, preferentemente, en el que el alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico es un alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico lácteo, cárnico o basado en cereales.
13. Un método para preparar un alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico que comprende la etapa de añadir la bacteria acidoláctica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, la cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 - 7, o el cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 - 11, a dicho alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico, y preferentemente en el que dicho alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico comprende o consta de un alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico fermentado, o comprende o consta de un alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico lácteo.
14. Un alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico obtenido o que puede obtenerse por el método de la reivindicación 13, en el que dicho alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico comprende la bacteria acidoláctica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, la cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 - 7, o el cultivo celular de

acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 - 11.

- 5 15. El uso de la bacteria acidoláctica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, de la cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 - 7, o del cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 - 11 para la preparación de un alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico.
- 10 16. Un método para aumentar la viscosidad de un alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico, que comprende la adición de la bacteria acidoláctica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, de la cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 - 7, o del cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 - 11, a dicho alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico.
- 15 17. Un alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico obtenido o que puede obtenerse por el método de la reivindicación 16, en el que dicho alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico comprende la bacteria acidoláctica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, la cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 - 7, o el cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 - 11.
- 20 18. El uso de la bacteria de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, de la cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 - 7, o del cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 - 11 para aumentar la viscosidad de un alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico.
- 25 19. Un método de acuerdo con la reivindicación 16 o un uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico comprende o consta de un alimento, aditivo alimentario, pienso, complemento nutricional o complemento probiótico lácteo.
- 30 20. Un método para identificar una bacteria perteneciente al género *Streptococcus thermophilus* que comprende una etapa de explorar la bacteria para determinar la secuencia expuesta en SEQ ID N.º 19 o un homólogo de la misma con al menos 90 % de identidad con la misma o un fragmento de SEQ ID N.º 19 que comprende al menos 90 % de la secuencia SEQ ID N.º 19, en el que la *Streptococcus thermophilus* es la misma que la cepa *Streptococcus thermophilus* depositada en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D - 38124 Braunschweig) con el número de depósito 18344 el 14 de junio de 2006, o es una *Streptococcus thermophilus* de acidificación rápida que genera una viscosidad en leche fermentada superior a 62 Pascales-segundos (Pa.s) después de 14 días de almacenamiento a 6°C.
- 35 21. Un método para identificar una bacteria perteneciente al género *Streptococcus thermophilus* que comprende la etapa de amplificar el locus CRISPR de una bacteria utilizando al menos un cebador oligonucleotídico directo y al menos uno inverso, en el que cada uno de los cebadores flanquea lados opuestos de uno o más espaciadores CRISPR que están ausentes en *Streptococcus thermophilus* DSMZ 18344, en el que la *Streptococcus thermophilus* es la misma que la cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D - 38124 Braunschweig) con el número de depósito 18344 el 14 de junio de 2006, o es una bacteria acidoláctica *Streptococcus thermophilus* de acidificación rápida que genera una viscosidad en leche fermentada superior a 62 Pascales-segundos (Pa.s) después de 14 días de almacenamiento a 6°C.
- 40 22. Un método de acuerdo con la reivindicación 21, en el que el cebador oligonucleotídico directo se hibrida con la SEQ ID N.º 1 y el cebador oligonucleotídico inverso se hibrida con cualquiera de SEQ ID N.º 2, SEQ ID N.º 3, SEQ ID N.º 4, SEQ ID N.º 5, SEQ ID N.º 6, SEQ ID N.º 7, SEQ ID N.º 8, SEQ ID N.º 9, SEQ ID N.º 10, SEQ ID N.º 11, SEQ ID N.º 12, SEQ ID N.º 13, SEQ ID N.º 14, SEQ ID N.º 15, SEQ ID N.º 16 y/o SEQ ID N.º 17.
- 45 23. Un método de acuerdo con la reivindicación 21, en el que el cebador oligonucleotídico directo se hibrida con cualquiera de SEQ ID N.º 2, SEQ ID N.º 3, SEQ ID N.º 4, SEQ ID N.º 5, SEQ ID N.º 6, SEQ ID N.º 7 y/o SEQ ID N.º 8 y un cebador oligonucleotídico inverso se hibrida con cualquiera de SEQ ID N.º 9, SEQ ID N.º 10, SEQ ID N.º 11, SEQ ID N.º 12, SEQ ID N.º 13, SEQ ID N.º 14, SEQ ID N.º 15, SEQ ID N.º 16 y/o SEQ ID N.º 17.
- 50 24. Un método de acuerdo con la reivindicación 21, en el que el cebador oligonucleotídico directo se hibrida con cualquiera de SEQ ID N.º 2, SEQ ID N.º 3, SEQ ID N.º 4, SEQ ID N.º 5, SEQ ID N.º 6, SEQ ID N.º 7 y/o SEQ ID N.º 8 y el cebador oligonucleotídico inverso se hibrida con SEQ ID N.º 18.
- 55 25. Un método de acuerdo con la reivindicación 21, en el que el cebador oligonucleotídico directo se hibrida con cualquiera de SEQ ID N.º 9, SEQ ID N.º 10, SEQ ID N.º 11, SEQ ID N.º 12, SEQ ID N.º 13, SEQ ID N.º 14, SEQ ID N.º 15, SEQ ID N.º 16 y/o SEQ ID N.º 17 y el cebador oligonucleotídico inverso se hibrida con SEQ ID N.º 18.
- 60
- 65

FIGURA 1

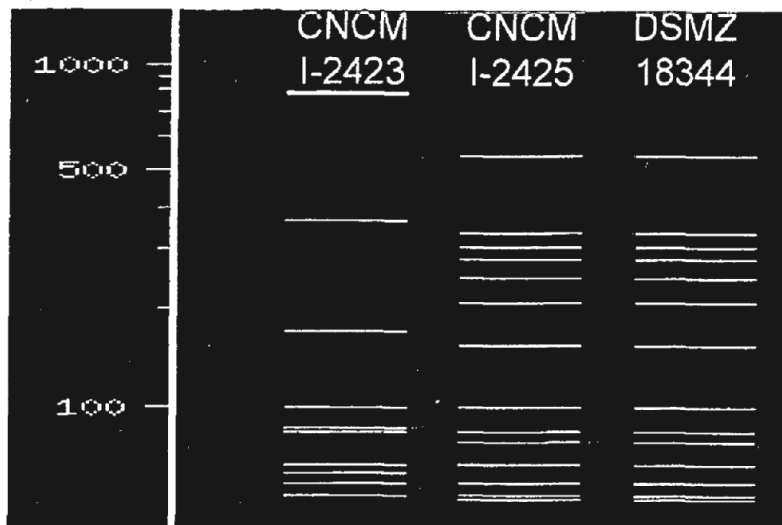


FIGURA 2

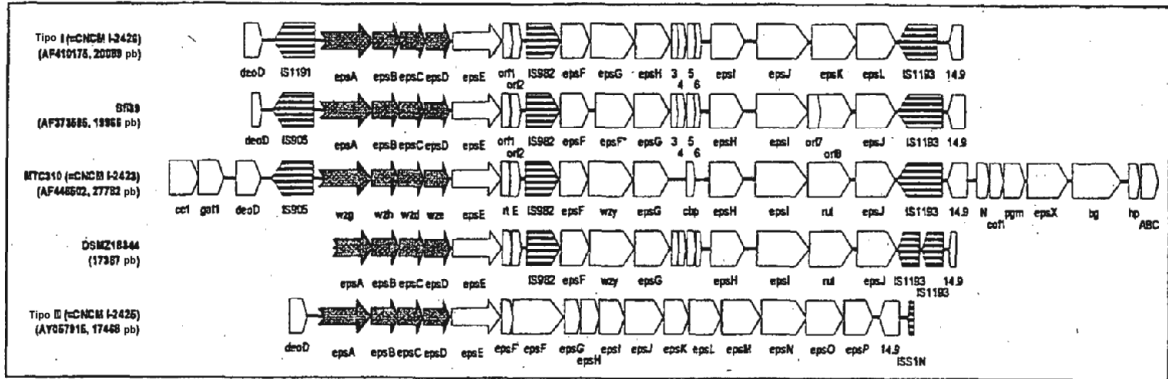


FIGURA 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
DSMZ18344	x	x	C	D	E	F	G	H	I	x	x	x	M	N	O	P	Q	R	S	S	T											
CNCM I-2425	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	x	T											
CNRZ385	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	x	T											
CNCM I-2423	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	U9	U10	U11	U12	U13	U14	U15	U16	U17	U18	U19	U20	U21	U22	U23	U24	U25	U26	U27	U28	U29	U30	U31	U32