



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 334 050**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/31** (2006.01) **C12N 15/54** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01) **C12N 9/12** (2006.01)

**A23C 9/12** (2006.01) **A23C 19/00** (2006.01)

**C07K 14/335** (2006.01) **C12R 1/245** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06022678 .4**

96 Fecha de presentación : **30.03.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1808485**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.07.2007**

54

Título: **Mutantes de *Lactobacillus casei* con regulación defectuosa del catabolismo del carbono.**

30

Prioridad: **31.03.2000 EP 00400894**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.03.2010**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.03.2010**

73

Titular/es:  
**Centre National de la Recherche Scientifique**  
**3, rue Michel Ange**  
**75016 Paris, FR**  
**COMPAGNIE GERVAIS DANONE y**  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas**  
**(CSIC)**

72

Inventor/es: **Deutscher, Josef;**  
**Pérez Martínez, Gaspar;**  
**Monedero García, Vicente;**  
**Viana Balester, Rosa;**  
**Benbadis, Laurent;**  
**Pierson, Anne y**  
**Faurie, Jean-Michel**

74

Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

ES 2 334 050 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

Mutantes de *Lactobacillus casei* con regulación defectuosa del catabolismo del carbono.

5 La presente invención se refiere a cepas mutantes de las bacterias del grupo *Lactobacillus casei* con una ruta de regulación del catabolismo del carbono defectuosa, y a su utilización en el procesamiento de alimentos fermentados.

10 Tal como se define en la presente memoria, el grupo *Lactobacillus casei* incluye las especies *L. casei*, así como las especies *L. paracasei* (antiguamente subespecie *paracasei* de *L. casei*), *L. rhamnosus* (antiguamente subespecie *rhamnosus* de *L. casei*) y *L. zaeae*. Esas especies están filogenéticamente emparentadas, de manera muy cercana, entre sí y sus respectivos genes ADNr 16S y 23S siempre muestran una similitud superior al 97,5% [Mori *et al.*, Int. J. Syst. Bacteriol., 47, 54-57, (1997)].

15 *L. casei* es reconocida como un prebiótico, es decir, un suplemento alimentario microbiano vivo con un efecto positivo sobre la salud del consumidor, y se utiliza mucho como iniciador en la industria láctica y en la preparación de alimentos fermentados, más específicamente, alimentos que contienen fermentos vivos.

20 La represión catabólica por carbono (CCR) es un mecanismo regulador que permite a las bacterias elegir entre diferentes fuentes de carbono según su valor metabólico y cambiar de una fuente de carbono a otra en función de su disponibilidad en el medio de cultivo. Una manifestación de la represión catabólica bien conocida es el crecimiento diáuxico que ocurre cuando las bacterias son cultivadas en presencia de glucosa y lactosa. Las curvas de crecimiento diáuxico muestran dos etapas distintas de crecimiento exponencial, separadas por un periodo de reposo. Durante la primera etapa de crecimiento, la glucosa reprime la síntesis de las enzimas necesarias para la utilización de lactosa, y por lo tanto, es la única fuente de energía de las bacterias. Cuando toda la glucosa es consumida, se da la etapa de reposo, durante la cual se sintetizan las enzimas para la utilización de la lactosa, permitiendo que la lactosa sea utilizada como una fuente de energía durante la segunda etapa del crecimiento.

25 Un objetivo principal de la represión catabólica es el transporte de azúcares al interior de las células bacterianas. En la *L. casei*, este transporte se realiza predominantemente mediante fosfoenolpiruvato: sistema fosfotransferasa de azúcares (PTS).

30 El PTS de las bacterias gram positivas ha sido estudiado principalmente en *Bacillus subtilis*; se ha mostrado que perjudica a la fosforilación de los azúcares y a su transferencia al interior de la célula mediante una cascada de fosforilaciones que implican las enzimas generales, no específicas del azúcar, EI y HPr, y las enzimas específicas del azúcar EIIA, EIIB y EIIC. La primera etapa es la fosforilación de EI a partir del fosfoenolpiruvato (PEP). La EI fosforilada (EI-P) cataliza la fosforilación de HPr, en la His-15 catalítica. La HPr fosforilada en su His-15 (referida como P-His-HPr) transfiere su grupo fosforilo a EIIA, que a su vez fosforiliza EIIB. La EIIB fosforilada (P-EIIB) asociada a la proteína de membrana EIIC, cataliza el consumo y la fosforilación simultánea de un carbohidrato específico.

35 Se ha mostrado que los componentes del sistema PTS, y más específicamente, la enzima HPr, están también implicados en otras rutas reguladoras.

40 Por ejemplo, P-His-HPr puede transferir su grupo fosforilo también a proteínas no PTS, tales como glicerol kinasa [Charrier *et al.*, J. Biol. Chem., 272, 14166-14174, (1997)] o a antiterminadores y activadores transcripcionales que poseen el dominio de regulación PTS (PRD) que contiene diversos sitios de fosforilación reconocidos por P-His-HPr [Tortosa *et al.*, J. Biol. Chem., 272, 17230-17237, (1997); Stülke *et al.*, Mol. Microbiol., 28, 865-874, (1998); Lindner *et al.*, Mol. Microbiol., 31, 995-1006, (1999)]. En todos los casos, la fosforilación dependiente de p-His-HPr lleva a la activación de la función de las proteínas no PTS y esta fosforilación se ha mostrado que sirve como un mecanismo de represión catabólica por carbono secundario en bacterias gram positivas [Deutscher *et al.*, J. Bacteriol., 175, 3730-3733, (1993); Krüger *et al.*, J. Bacteriol., 178, 2637-2644, (1996); Martin-Verstraete *et al.*, Mol. Microbiol., 28, 293-303, (1998)]. En la *Lactobacillus casei*, el antiterminador LacT, que regula la expresión del operón *lac*, contiene dos PRD y parece que es controlado por este mecanismo.

45 En las bacterias gram positivas, la HPr puede también ser fosforilada mediante la HPr kinasa/fosfatasa HprK bifuncional [Galinier *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 1823-1828, (1998); Reizer *et al.*, Mol. Microbiol., 27, 1157-1169, (1998); Brochu y Vadeboncoeur, J. Bacteriol., 181, 709-717, (1999); Kravanja *et al.*, Mol. Microbiol., 31, 59-66, (1999)]. En la *Bacillus subtilis*, esta fosforilación, que ocurre en la Ser-46 reguladora [Deutscher *et al.*, Biochemistry, 25, 6543-6551, (1986)], es estimulada mediante fructosa-1,6-bisfosfato e inhibida mediante fosfato inorgánico [Galinier *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 1823-1828, (1998)]. La HPr fosforilada en Ser-46 (referida como P-Ser-HPr), participa en el mecanismo principal de represión/activación catabólica por carbono operativo en *bacilli* y presumiblemente en otras bacterias gram positivas [Deutscher *et al.*, Mol. Microbiol., 42, 171-178, (1997)]. Funciona como un correpresor para la proteína de control de catabolito CcpA, un miembro de la familia LacI/GaIR de los represores/activadores transcripcionales [Henkin *et al.*, Mol. Microbiol., 5, 575-584, (1991)]. El complejo formado entre CcpA y P-Ser-HPr se ha mostrado que enlaza a los elementos de respuesta de catabolito (cre) [Fujita y Miwa, J. Bacteriol., 176, 511-513, (1994); Gösseringer *et al.*, J. Mol. Biol., 266, 665-676, (1997); Kim *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 9590-9595, (1998); Galinier *et al.*, J. Mol. Biol. 286, 307-314, (1999); Martin-Verstraete *et al.*, Mol. Microbiol., 28, 293-303, (1999)], sitios operadores que preceden o solapan los promotores o localizados en la región 5' de los operones y los genes reprimidos por catabolito [Hueck *et al.*, Res. Microbiol., 145, 503-518, (1994)]. Por

## ES 2 334 050 T3

ejemplo, se encuentra un elemento *cre* funcional en la región promotor del operón de la lactosa *lacTEGF* de *L. casei*, que comprende los genes *lacE* y *lacF* que codifican respectivamente las enzimas de transporte de lactosa EIICB<sup>Lac</sup> y EIIA<sup>Lac</sup> conjuntamente con los genes que codifican una proteína antiterminadora (*lacT*), y una fosfo-beta-galactosidasa (*lacG*) [Gosalbes *et al.*, J. Bacteriol., 181, 3928-3934, (1999)].

5

Los genes que codifican componentes del sistema CCR, y más específicamente los genes relacionados con el sistema PTS, tales como *ptsI* y *ptsH* que codifican, respectivamente, las enzimas EI y HPr del sistema PTS, *hprK* que codifica la HPr kinasa/fosfatasa, y *ccpA* han sido caracterizados en algunas especies de bacterias gram positivas.

10

En la *L. casei*, el gen *ccpA* [Monedero *et al.*, J. Bacteriol., 179, 6657-6664, (1997)], y los genes *lacT*, *lacE*, *lacG* y *lacF* [Gosalbes *et al.*, referenciado anteriormente; Poter y Chassy, Gene, 62, 263-276, (1988); Alpert y Chassy, Gene, 62, 277-288, (1988); Alpert y Chassy, J. Biol. Chem., 265, 22561-22568, (1990); Alpert y Siebers, J. Bacteriol., 179, 1555-1562, (1997)] han sido clonados y caracterizados hasta ahora.

15

Recientemente, los presentes inventores han identificado, clonado y secuenciado los genes *ptsI*, *ptsH* y *hprK* de la *L. casei*.

20

La secuencia nucleotídica del operón *ptsHI*, y las secuencias peptídicas de HPr y EI de la *L. casei* se dan a conocer, respectivamente, en el listado de secuencias adjunto bajo los identificadores SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, y SEQ ID NO: 3. La secuencia del gen *HprK* está disponible en GENBANK bajo el número de acceso Y18948.

25

Los inventores han estudiado recientemente el efecto de las mutaciones en *ptsI*, *ptsH* y *hprK*, así como el efecto de las mutaciones en *ccpA* sobre las propiedades metabólicas y el crecimiento de la *L. casei*. Encontraron, de manera inesperada, que las cepas de *L. casei* con mutaciones que perjudicaban la regulación del mecanismo de represión catabólica por carbono que implica la enzima PTS HPr, y más específicamente las mutaciones que perjudicaban la regulación del sistema PTS, y/o las mutaciones que perjudicaban la regulación de la transcripción de los genes reprimidos por catabolitos mediante la unión del complejo CcpA/P-Ser-HPr, poseen una capacidad mejorada de producir compuestos útiles en la industria alimentaria, tales como compuestos de aroma y/o polisacáridos.

30

Un objetivo de la presente invención es la utilización de un mutante de la *L. casei* con por lo menos una mutación en el gen *ptsH* que perjudica la regulación del mecanismo de represión catabólica por carbono (CCR) que implica la enzima PTS HPr, para la preparación de un producto alimentario.

35

Preferentemente, dicho mutante tiene por lo menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en:

- cualquier mutación en el gen *ptsH* que afecte la capacidad de HPr de ser fosforilada en la His-15, o para fosforilar la EIIA;
- cualquier mutación en el gen *ptsH* que afecte la capacidad de HPr de ser fosforilada en la Ser-46.

40

45

Entre los ejemplos no limitativos de los mutantes de *L. casei* que pueden ser utilizados según la invención son mutantes del gen *ptsH* con por lo menos una mutación que resulta en la expresión de una HPr con por lo menos una sustitución de aminoácidos en la posición 15 y/o en la posición 46 y/o en la posición 47 de la HPr de tipo salvaje, y/o por lo menos una mutación que resulta en la expresión de una HPr con delección de por lo menos uno de los aminoácidos 15, 46, y/o 47 de la HPr de tipo salvaje.

50

La invención también proporciona:

- mutantes de *L. casei* con por lo menos una mutación en por lo menos el gen *ptsH*, en los que dicha mutación perjudica por lo menos una de las funciones del producto de dicho gen;
- mutantes de *L. casei* aptos para uso alimentario, con por lo menos una mutación en el gen *ptsH* que perjudica por lo menos una de las funciones del producto de dicho gen.

55

60

Los "mutantes aptos para uso alimentario" se definen en la presente memoria como bacterias mutantes aceptables para la utilización en la preparación de alimentos. Para que sean catalogados como aptos para uso alimentario, los mutantes no deben comprender secuencias derivadas de microorganismos diferentes de los utilizados en la industria alimentaria. Preferentemente, no deben comprender secuencias derivadas de microorganismos diferentes a los que pertenecen a las especies de las que deriva el mutante. También, no deben comprender secuencias de ADN potencialmente dañinas, tales como genes de resistencia antibiótica.

65

Los mutantes de la invención pueden ser obtenidos mediante métodos convencionales de la biología molecular. A partir de la secuencia del gen *ptsH* de la *L. casei*, un experto en la materia puede fácilmente diseñar herramientas que permiten la realización de las mutaciones deseadas mediante mutagénesis dirigida. Dichas mutaciones pueden

## ES 2 334 050 T3

ser obtenidas mediante inserción, deleción y/o sustitución de un nucleótido o de varios nucleótidos, adyacentes o no adyacentes.

5 Dichas mutaciones pueden, por ejemplo, ser obtenidas mediante la deleción de dicha secuencia de ADN regulador o mediante la susodicha inserción, deleción y/o sustitución en la misma, de un nucleótido o de varios nucleótidos, adyacentes o no adyacentes.

10 Dichas mutaciones incluyen en concreto cualquier mutación que resulte en la producción de una proteína que presenta por lo menos una deleción, inserción o sustituciones no conservativas de uno o varios residuos de aminoácidos en un dominio esencial para la actividad biológica de dicha proteína.

15 A continuación, el gen mutante obtenido de esta manera es clonado en un vector, preferentemente un vector de expresión, y utilizado para transformar las células huésped de *L. casei* mediante cualquier método adecuado, conocido en sí mismo. Los métodos y vectores adecuados para la transformación de la *L. casei* se dan a conocer, por ejemplo, en POSNO *et al.* [Appl. Environ. Microbiol., 57, 1822-1828, (1991)].

20 A modo de ejemplo, puede utilizarse un vector extracromosómico capaz de replicarse en *L. casei*. Sin embargo, con el fin de obtener mutantes estables, resulta preferente la utilización de un vector que permita la integración de un gen mutante en el cromosoma de la *L. casei*.

25 La integración de un gen mutante en el cromosoma bacteriano ocurre mediante la recombinación del material genético del vector en una posición homóloga (generalmente, el alelo de tipo salvaje del gen mutante) en el cromosoma bacteriano. La integración puede ser el resultado de un evento de recombinación simple o doble. Los eventos de recombinación simple resultan en la integración del vector completo. Los eventos de recombinación doble llevan a la escisión de las secuencias del vector exógeno.

30 A modo de ejemplo, un método para la integración de un gen *lacT*, *lacE* o *lacF* mutante en el cromosoma de la *L. casei* es dado a conocer por GOSALBES *et al.* [J. Bacteriol. 181, 3928-3934, (1999)]. Este método incluye la clonación de un gen de tipo salvaje en un plásmido integrativo (pRV300, con un marcador *Erm<sup>R</sup>*), induciendo una mutación en el gen clonado (por ejemplo, mediante el corte del gen con una enzima de restricción e introduciendo una mutación convirtiendo el sitio de restricción en un extremo romo), transformando la *L. casei* con el plásmido que comprende el gen mutado, cultivando las bacterias en un medio selectivo que contiene eritromicina con el fin de seleccionar las bacterias que hayan integrado el plásmido mediante un evento de recombinación simple (que son *Erm<sup>R</sup>*). Un cultivo adicional de estas bacterias *Erm<sup>R</sup>* en medio no selectivo (es decir, sin eritromicina) permite la obtención de bacterias que han experimentado un evento de recombinación doble que lleva a la escisión de las secuencias del vector.

40 Un método como éste puede ser utilizado, por ejemplo, para obtener mutantes aptos para el uso alimentario en los que la función de la HPr resulta completa o parcialmente perjudicada. Este método comprende:

- 45 - transformar la *L. casei* con un vector integrativo que comprende un gen *ptsH* mutado, y que comprende, además, un gen marcador selectivo;
- cultivar las bacterias bajo condiciones selectivas para el gen marcador (por ejemplo, si el gen marcador es un gen de resistencia a los antibióticos, en presencia del antibiótico correspondiente) y recuperando las bacterias capaces de crecer en estas condiciones, es decir, las que han integrado el vector en su cromosoma mediante un evento de recombinación simple;
- 50 - cultivar dichas bacterias bajo condiciones no selectivas para el gen marcador con el fin de obtener bacterias que han experimentado un evento de recombinación doble que lleva a la escisión de las secuencias del vector.

55 Este evento de recombinación doble produce bacterias que presentan un fenotipo de tipo salvaje y bacterias que presentan la mutación deseada. A continuación, estas últimas pueden ser filtradas en base a sus propiedades fenotípicas, y/o mediante amplificación PCR de la región cromosómica a la que iba dirigida la mutación y el análisis de los productos de amplificación (por ejemplo, comparación de los perfiles de restricción). La presencia de la mutación deseada puede además ser confirmada mediante secuenciación de ADN.

60

Un método preferente utilizado para obtener mutantes aptos para uso alimentario en los que la función catalítica de la HPr se ve sólo ligeramente perjudicada comprende:

- 65 - transformar una cepa mutante de *L. casei* en la que el gen *ptsI* está inactivado de tal manera que la función de la EI resulta totalmente perjudicada, con un vector integrativo que comprende un operón *ptsHI* que consiste en un gen *ptsI* de tipo salvaje y el gen *ptsH* mutante, y que comprende, además, un gen marcador selectivo;

## ES 2 334 050 T3

- cultivar las bacterias transformadas en presencia de lactosa bajo condiciones selectivas para el gen marcador, y recuperar las bacterias que hayan integrado el vector en su cromosoma mediante un evento de recombinación simple;
- cultivar las bacterias seleccionadas en presencia de lactosa y bajo condiciones no selectivas para el gen marcador con el fin de obtener bacterias que hayan experimentado un evento de recombinación doble que lleve a la escisión de las secuencias del vector.

Los clones que contienen un gen *ptsI* intacto y un gen *ptsH* mutado pueden ser seleccionados en base a su crecimiento ligeramente reducido en presencia de lactosa. La presencia de la mutación puede ser confirmada mediante secuenciación de ADN.

Las cepas mutantes de la invención pueden también obtenerse a partir de cepas de tipo salvaje de la *L. casei* mediante métodos de mutación clásicos, por ejemplo, mediante mutagénesis inducida químicamente o por medio de radiación ultravioleta. Pueden ser también mutantes naturales aislados de las poblaciones de *L. casei*.

Por ejemplo, las fusiones de genes reporter a los genes activados o reprimidos por catabolitos podrían ser utilizados para identificar mutantes *ptsH* con represión de catabolitos de carbono o activación de catabolitos de carbono defectuosas.

Las cepas mutantes de la invención también pueden ser seleccionadas en base a sus propiedades metabólicas. Por ejemplo: los mutantes en el gen *ptsI* o en el gen *ptsH* pueden seleccionarse en base a su resistencia a la 2-deoxiglucosa. Los mutantes del gen *ptsI* o los mutantes del gen *ptsH* que presentan una EI o una HPr inactiva, respectivamente, pueden también seleccionarse en base a su capacidad de crecimiento en azúcar no PTS pero no en azúcares PTS.

La invención también proporciona un proceso para la preparación de productos alimentarios o aditivos alimentarios en el que dicho proceso comprende la fermentación de un sustrato alimentario con una cepa mutante de la *L. casei*, tal como se ha definido anteriormente.

Preferentemente, dicho producto alimentario es un producto láctico.

Según una forma de realización preferente, el proceso de la invención comprende la preparación de un producto alimentario enriquecido con compuestos de aroma (tales como acetato, acetoina, diacetil, hidroxí-3-pentanona, propionato) mediante la fermentación de un sustrato alimentario con una cepa de *L. casei* que presenta una mutación como la definida anteriormente.

La invención también proporciona productos alimentarios fermentados que pueden obtenerse mediante el proceso de la invención y, en concreto, productos alimentarios fermentados que comprenden por lo menos una cepa mutante de *L. casei*, tal como se ha definido anteriormente.

La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante la descripción adicional que sigue a continuación, que hace referencia a los ejemplos de construcción y utilización de las cepas mutantes de la *L. casei* de la invención. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos se proporcionan sólo a modo de ilustración de la invención y no constituyen, en manera alguna, una limitación de la misma.

### Ejemplo 1

#### Caracterización de los genes *ptsH* y *ptsI* de la *L. casei*

##### Cepas, plásmidos y condiciones de cultivo

Las cepas y los plásmidos de la *L. casei* utilizados para la caracterización de los genes *ptsH* y *ptsI* y la construcción de los mutantes de los mismos se listan en la Tabla 1a y 1b a continuación.

TABLA 1a

CEPA	GENOTIPO	ORIGEN
( <i>L. casei</i> )		
BL23	tipo salvaje	Bruce Chassy
BL30	<i>man</i>	(VEYRAT <i>et al.</i> , 1994)
BL71	<i>ccpA</i>	(MONEDERO <i>et al.</i> , 1997)

ES 2 334 050 T3

BL72	<i>man ccpA</i>	(GOSALBES <i>et al.</i> , 1997)
BL121	<i>ptsH1</i> (S46AHP <sub>r</sub> )	Esta memoria
BL122	<i>ptsH2</i> (S46THP <sub>r</sub> )	Esta memoria
BL123	<i>ptsH3</i> (I47THP <sub>r</sub> )	Esta memoria
BL124	<i>ptsI</i> : pVME800	Esta memoria
BL126	<i>ptsI1</i> (cambio de marco de lectura introducido en la primera posición <i>EcoRI</i> de <i>ptsI</i> )	Esta memoria

TABLA 1b

PLÁSMIDO	PROPIDADES	ORIGEN
pUC18		PHARMACIA-BIOTECH
pRV300	pBluescript SK con el gen pAMβ1 EmR	(LELOUP <i>et al.</i> , 1997)
pUCR-HI	pUC18 con un fragmento PCR de 1,6 kb con parte de <i>ptsH</i> y <i>ptsI</i>	Esta memoria
pVME800	pRV300 con un fragmento <i>EcoRI</i> de 865 bp con fragmento interno de <i>ptsI</i>	Esta memoria
pVMS1	pRV300 con un fragmento de 9 kb aguas abajo de <i>ptsI</i>	Esta memoria
pVMH1	pRV300 con parte de <i>ptsI</i> , <i>ptsH</i> completo y 105 bp antes de <i>ptsH</i>	Esta memoria
pVMH2	Derivado de pVMH1 (codón 46 de <i>ptsH</i> es GCT para Ala)	Esta memoria
pVMH3	Derivado de pVMH1 (codón 46 de <i>ptsH</i> es ACT)	Esta memoria

## ES 2 334 050 T3

5		para Thr)	
10	pVMH4	Derivado de pVMH1 (codón 46 de <i>ptsH</i> es GAT para Asp)	Esta memoria
15	pVMH5	Derivado de pVMH1 (codón 47 de <i>ptsH</i> es ACC para Thr)	Esta memoria
20	pVMR10	Derivado de pVMH1 con un cambio en el marco de lectura en la primera posición <i>EcoRI</i> de <i>ptsI</i>	Esta memoria
25			
30			

35 Las células de *L. casei* se cultivaron a 37°C bajo condiciones estáticas en un medio MRS (OXOID) o un medio de fermentación MRS (ADSA-MICRO, Scharlau S.A., Barcelona, España) que contiene un 0,5% de los carbohidratos indicados.

40 Para los experimentos de crecimiento diáuxico, las cepas de *L. casei* se cultivaron en un medio basal MRS que contiene 1 l:polipeptona (DIFCO), 10 g; extracto de carne (DIFCO), 10 g; extracto de levadura (DIFCO), 5 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-3H<sub>2</sub>O, 2 g; acetato de sodio, 5 g; citrato de diamonio, 2 g; MgSO<sub>4</sub>, 0,1 g; MnSO<sub>4</sub>, 0,05 g y TWEEN 80, 1 ml. El medio basal se suplementó con diferentes azúcares a una concentración final de 0,5%, pero para los experimentos de crecimiento diáuxico las concentraciones de azúcar se modificaron tal como se indica en el texto. La *E. coli* DH5α se cultivó con agitación a 37°C en un medio Luria-Bertani (LB). Las bacterias transformadas se depositaron en los medios sólidos respectivos que contienen agar al 1,5%. Las concentraciones de antibióticos utilizadas para la selección de los transformantes de *E. coli* eran de 100 µg por ml de ampicilina, y 300 µg por ml de eritromicina y para la selección de los integrantes de la *L. casei* 5 µg por ml de eritromicina. El patrón de utilización de azúcar de determinadas cepas se determinó con las galerías API50-CH (BIOMERIEUX, Marcy l'Etoile, Francia).

### 50 *Purificación de HPr*

Las células de un cultivo, realizado durante la noche, (1 l de medio RMS) fueron centrifugadas y lavadas dos veces con Tris-HCl 20 mM, pH 7,4. Las células fueron resuspendidas en tampón de bicarbonato de amonio 20 mM, pH 8 (2 ml por gramo de sedimento celular), fueron sonicadas (BRANSON SONIFIER 250) y a continuación fueron centrifugadas para eliminar los restos celulares. Debido a que HPr resiste los tratamientos por calor, el sobrenadante se mantuvo a 70°C durante 5 minutos para precipitar la mayor parte de las demás proteínas. Se realizó una etapa de centrifugación adicional para eliminar las proteínas desnaturalizadas por el calor. El sobrenadante se cargó en una columna Sephadex G-75 (42 cm x 1,6 cm) equilibrada con bicarbonato de amonio 20 mM, pH 8, eluido con el mismo tampón, y se recogieron fracciones de 1,5 ml. Para realizar un ensayo para la presencia de HPr en estas fracciones, se llevó a cabo un ensayo de complementación de mutantes con la cepa mutante para el gen *ptsH* de *S. aureus* S797A [HENGSTENBERG *et al.*, J. Bacteriol., 99, 383-388, (1969)]. Se detectó actividad HPr en las fracciones 48 a 56. Estas fracciones se agruparon y se concentraron a un volumen final de 500 µl.

65 Se separó la mitad de la HPr parcialmente purificada mediante cromatografía de fase inversa en una columna VY-DAC C-18 HPLC (300 Å, 250 mm x 4,6 mm; TOUZART ET MATIGNON, Francia). El solvente A era una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v) y el disolvente B contenía acetonitrilo al 80% y ácido trifluoroacético al 0,04%. Las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de 5% a 100% del disolvente B en 60 minutos a una velocidad de flujo de 500 µl/minuto. Las fracciones se recogieron manualmente con un volumen de aproximadamente

## ES 2 334 050 T3

500  $\mu$ l. La presencia de HPr en las fracciones fue sometida a ensayo mediante un ensayo de fosforilación, dependiente de PEP, que contenía  $MgCl_2$  10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, 10  $\mu$ l de alícuotas de las fracciones, [ $^{32}P$ ]PEP 10  $\mu$ M y 1,5  $\mu$ g de enzima I(His)<sub>6</sub> de *B. subtilis*. Las enzimas I(His)<sub>6</sub> y HPr(His)<sub>6</sub> de *B. subtilis* se purificaron mediante una cromatografía iónica en una columna Ni-NTA SEPHAROSE (QIAGEN) después de la expresión a partir de los plásmidos pAG3 y pAG2, respectivamente [GALINIER *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 8439-8444, (1997)]. Se utilizó como estándar la HPr(His)<sub>6</sub> de *B. subtilis* en las reacciones de fosforilación. Se preparó el [ $^{32}P$ ]PEP a partir de  $\gamma$ -[ $^{32}P$ ]ATP mediante la reacción de intercambio de piruvato kinasa [ROOSSEN *et al.*, Biochim. Biophys. Acta., 760, 185-187, (1983)]. Las mezclas de ensayo fueron incubadas durante 10 minutos a 37°C y fueron separadas en geles de poliacrilamida al 15% que contienen SDS al 1% [LAEMMLI, Nature, 227, 680-685, (1970)]. Después del secado de los geles, se detectaron las proteínas radiomarcadas mediante una autorradiografía. Se descubrió que el HPr se eluía en acetonitrilo al 60% en las fracciones 44 a 46. Estas fracciones se agruparon, se liofilizaron y se utilizaron alícuotas correspondientes a aproximadamente 0,5 nmol de HPr para determinar los 21 primeros aminoácidos N-terminales de la HPr mediante degradación automatizada de Edman en un dispositivo microsecuenciador 473A APPLIED BIOSYSTEMS.

### Clonación de los fragmentos *ptsHI* de la *L. casei* amplificados mediante PCR

Para amplificar fragmentos de ADN de la *L. casei* que contenían el gen *ptsH* y parte del gen *ptsI*, fueron diseñados los siguientes oligonucleótidos degenerados en base a la secuencia N-terminal de la HPr y a las regiones fuertemente conservadas en la enzima I, que se detectaron llevando a cabo un alineamiento de diferentes secuencias de la enzima I:

PTS-H2 (5'-ATG GAA AAR CGN GAR TTY AAY-3') (MEKREFN);

PTS-I3 (5'-GCC ATN GTR TAY TGR ATY ARR TCR TT-3') (NDLIQYTMA);

PTS-I4 (5'-CCR TCN SAN GCN GCR ATN CC-3') (GIAASDG);

Donde R se refiere a A ó G, Y se refiere a C ó T, S se refiere a C ó G y N se refiere a cualquier nucleótido. Se muestran subrayados y en paréntesis la secuencia de aminoácidos N-terminal de la HPr y las secuencias conservadas de la enzima I que sirvieron para diseñar los cebadores.

La amplificación PCR de los dos fragmentos que comprenden parte del operón *ptsHI* se realizó con un dispositivo termociclador PROGENE (REAL, S.L., Valencia, España) programado para 30 ciclos que incluían los tres etapas siguientes: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C y 1 minuto a 72°C, seguido de un ciclo de extensión final de 5 minutos a 72°C.

Dos combinaciones de cebadores (PTS-H2/PTS-I3 y PTS-H2/PTS-I4) proporcionaron fragmentos amplificados por PCR de 1,6 kb y 0,3 kb, respectivamente. La secuenciación de los productos de la PCR reveló que las secuencias de aminoácidos deducidas presentaron una fuerte similitud con las secuencias de las enzimas I y HPr conocidas. Como se esperaba, ambos fragmentos de ADN empezaban con el extremo 5' de *ptsH* y se extendían a la región en *ptsI* que codifica la secuencia conservada elegida como base para el segundo cebador. El mayor de los dos fragmentos obtenidos con el cebador PTS-I3 fue clonado a pUC18, proporcionando un plásmido pUCR-H1. La clonación de los fragmentos de la PCR se llevó a cabo con el Kit de SURECLONE Ligation (PHARMACIA BIOTECH, Ltd., Uppsala, Suiza).

Un fragmento *EcoRI* de 865 pb que contenía una parte interna del gen *ptsI* fue obtenido a partir del plásmido pUCR-H1 y fue subclonado en el vector suicida pRV300 [LELOUP *et al.*, Appl. Environm. Microbiol., 63, 2117-2123, (1997)], proporcionando el plásmido pVME800.

Este plásmido fue utilizado para transformar la cepa BL23 de tipo salvaje de la *L. casei*, y la integración del plásmido en la posición correcta (*ptsI*::pVME800) se verificó mediante PCR y transferencia Southern.

El análisis de restricción de la región *ptsHI* fue llevado a cabo mediante hibridación Southern utilizando ADN aislado a partir de un integrante (BL124) con el propósito de identificar las enzimas de restricción que permitían la clonación de los genes *ptsH* y *ptsI* junto con sus regiones flanqueadoras.

La clonación de las regiones flanqueadoras de la posición de inserción del plásmido pRV300 se llevó a cabo de la manera siguiente: se digirió ADN (10  $\mu$ g) de la cepa BL124 de *L. casei* con *SacI* o *HindIII*, se diluyó 500 veces, se religó con T4 ADN ligasa y se utilizaron diferentes alícuotas para transformar *E. coli* DH5 $\alpha$ . El ADN del plásmido se aisló a partir de varios transformantes y a continuación se secuenció.

La digestión del ADN de la B124 con *SacI* y la religación de los fragmentos de ADN obtenidos permitió aislar el plásmido pVMS1 que contenía un inserto de aproximadamente 9 kb. La secuenciación parcial de este inserto reveló que contenía la parte 3' de *ptsI* y su región aguas abajo. El mismo experimento llevado a cabo con *HindIII* permitió aislar el plásmido pVMH1 que contenía un inserto de 2,4 kb que comprendía el gen *ptsH* completo junto con parte de su región promotora y la parte 5' de *ptsI*.

## ES 2 334 050 T3

La secuencia que contenía el promotor *ptsH* completo y 560 pb de la región aguas arriba se obtuvo posteriormente, mediante PCR inversa. Con este propósito, el ADN aislado a partir de la cepa BL23 de tipo salvaje de la *L. casei* se cortó con PstI y se religó con T4 ADN ligasa (GIBCO-BRL). Se utilizaron 20 ng del ADN ligado y dos cebadores derivados a partir de la parte 5' de *ptsH* y orientados en direcciones opuestas para amplificar específicamente mediante PCR el fragmento de 2,3 kb que contenía la región aguas arriba de *ptsH*. La secuencia que comprendía 560 pb aguas arriba del promotor de *ptsHI* ha sido determinada en este fragmento.

En total, se ha secuenciado un tramo continuo de 4.150 pb. Contenía los genes *ptsH* y *ptsI* completos y un marco abierto de lectura (ORF) situado aguas abajo de *ptsI*. El codón de terminación de *ptsH* se solapaba con el codón de inicio de *ptsI* por 1 pb, lo que sugería que estos dos genes están organizados en un operón. Mientras que la HPr y la enzima I codificados de *L. casei* presentaban similitudes de secuencia de entre un 65% y un 85% cuando se compararon con sus homólogos en *B. subtilis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus sakei*, *Streptococcus salivarius* o *Enterococcus faecalis*, la proteína codificada por el ORF situado aguas abajo de *ptsI* presentaba similitud a las permeasas de azúcar XylE [DAVIS y HENDERSON, J. Biol. Chem., 262, 13928-13932, (1987)] y GalP [PAO *et al.*, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 1-34, (1998)] de *Escherichia coli*. No se pudo detectar ningún ORF en la región de 560 pb aguas arriba del promotor *ptsHI*.

La Figura 1 es una representación esquemática del fragmento cromosómico de ADN de *L. casei* secuenciado que contiene el operón *ptsHI*. Se indican los tres ORF detectados en este fragmento, el promotor y el terminador del operón *ptsHI* y diversos sitios de restricción importantes. Los fragmentos de la PCR inicialmente aislados H2/I4 y H2/I3 (flanqueados por flechas enfrentadas) y el fragmento de *EcoRI* de 865 pb, que se denominó E800 y se subclonó en pRV300, se muestran en la parte superior de la presentación esquemática del fragmento de ADN total.

### Análisis transcripcional del operón *ptsHI* de *L. casei*

Para determinar el tamaño de las transcripciones *ptsHI* y para comprobar el efecto de un *man* (inhibe el consumo de glucosa mediante el sistema PTS) y una mutación de *ccpA* sobre la expresión de *ptsHI*, se realizaron transferencias Northern con el ARN aislado no sólo a partir de la cepa BL23 de tipo salvaje de *L. casei*, sino también a partir de las cepas mutantes BL30 (*man*) [VEYRAT *et al.*, Microbiology, 140, 1141-1149, (1994)], BL71 (*ccpA*) [MONEDERO *et al.*, J. Bacteriol., 179, 6657-6664, (1997)] y BL72 (*man ccpA*) [GOSALBES *et al.*, FEMS Microbiol. Lett., 148, 83-89, (1997)], que se cultivaron en un medio que contenía glucosa, lactosa o ribosa.

Las cepas de *L. casei* se cultivaron en un medio de fermentación MRS suplementado con un 0,5% de diferentes azúcares a un OD a 550 nm comprendido en el intervalo de 0,8 a 1. Las células de un cultivo de 10 ml se recogieron mediante centrifugación, se lavaron con EDTA 50 mM y se resuspendieron en 1 ml de TRIZOL (GIBCO BRL). Se añadieron 1 g de perlas de cristal (diámetro 0,1 mm) y se rompieron las células mediante agitación de la suspensión celular en un dispositivo FASTPREP (BIOSPEC, Bartlesville, OK, USA) dos veces durante 45 segundos. El ARN fue aislado según el procedimiento recomendado por el fabricante de TRIZOL, fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa formaldehído y transferido a unas membranas HYBOND-N (Amersham).

Los experimentos de hibridación se llevaron a cabo con sondas específicas para *ptsH* o específicas para *ptsI*. Con ambas sondas, pudo detectarse una banda de ARNm de aproximadamente 2,1 kb, lo que concuerda con el tamaño esperado para los genes *ptsH* y *ptsI* combinados, confirmando que estos dos genes se encuentran organizados en un operón y que la transcripción termina en la estructura tallo-bucle situada aguas abajo de *ptsI*.

Las mediciones densitométricas de las bandas de hibridación en el ARN aislado a partir de las células de los diferentes mutantes cultivados en un medio que contenía glucosa, lactosa o ribosa mostraron que la expresión del operón *ptsHI* era moderadamente inducida por la glucosa en el tipo salvaje y en el mutante *ccpA*, mientras que este efecto era menos pronunciado en las cepas con la mutación *man*.

## Ejemplo 2

### Construcción y caracterización de los mutantes *ptsH* y *ptsI*

#### I. Construcción y caracterización de los mutantes *ptsI*

##### Mutante BL 124

Este mutante es el resultado de la transformación de la cepa BL23 de tipo salvaje de *L. casei* con el plásmido pVME800, tal como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

Al contrario que la cepa de tipo salvaje, este mutante ya no puede producir ácido a partir de fructosa, manosa, manitol, sorbosa, sorbitol, amigdalina, arbutina, salicina, celobiosa, lactosa, tagatosa, trehalosa y turanosa. Sin embargo, todavía puede metabolizar ribosa, galactosa, glucosa, N-acetilglucosamina, aesculina, maltosa y gluconato, lo que sugiere que en *L. casei* existen sistemas de transporte independientes del sistema PTS para esta segunda clase de azúcares.

*Mutante BL 126*

El plásmido pVMH1 fue parcialmente digerido con *EcoRI* y fue convertido en extremo romo (rellenado con el fragmento Klenow) antes de ser religado y utilizado para transformar *E. coli* DH5 $\alpha$ . A partir de uno de los transformantes resultantes, pudo ser aislado un plásmido (pVMR10) que llevaba una mutación de cambio en el marco de lectura en la posición de *EcoRI* situada en el nucleótido 327 del gen *ptsI*, tal como fue confirmado mediante un análisis de restricción y secuenciación de ADN (inserción de 4 pares de bases adicionales). El plásmido pVMR10 fue posteriormente utilizado para transformar la cepa BL23 de *L. casei* y un integrante *ptsI*\* resistente a la eritromicina resultante de una recombinación tipo Campbell fue aislado.

A partir de esta cepa, pudo obtenerse un mutante *ptsI* (*ptsI1*, BL126) mediante una segunda recombinación. BL126 era sensible a la eritromicina y presentaba un patrón de fermentación idéntico al encontrado para el mutante *ptsI*::pVME800 de BL124. Curiosamente, no pudo detectarse ARNm de *ptsH* en BL126 mediante una transferencia Northern.

## II. Construcción de los mutantes *ptsH* modificados en la Ser-46 o en la Ile-47

Se llevó a cabo la mutagénesis dirigida al sitio basada en PCR con el gen *ptsH* de *L. casei* presente en el plásmido pVMH1 (Tabla 1) para sustituir la Ser-46 con alanina, ácido aspártico o treonina, o la Ile-47 con treonina.

La mutagénesis dirigida al sitio se llevó a cabo con el fin de sustituir el codón para la Ser-46 del gen *ptsH* de *L. casei* por un codón para Ala, Asp o Thr y el codón para la Ile-47 por un codón para Thr.

Con este propósito, se llevó a cabo una amplificación por PCR utilizando como plantilla el plásmido pVMH1 que contenía el gen *ptsH* de tipo salvaje de *L. casei* así como la parte 5' del gen *ptsI* y como cebadores el cebador inverso de pBLUESCRIPT (STRATAGENE) y uno de los siguientes oligonucleótidos:

5' *ptsHS46A* (5'-AAG AGC *GTT AAC TTG AAG* GCT ATC ATG GGC G-3');

5' *ptsHS46T* (5'-AAG AGC *GTT AAC TTG AAG* ACT ATC ATG GGC G-3');

5' *ptsHS46D* (5'-AAG AGC *GTT AAC TTG AAG* GAT ATC ATG GGC G-3');

5' *ptsHI47T* (5'-AAG AGC *GTT AAC TTG AAG* TCT ACC ATG GGC G-3').

En estos oligonucleótidos, los codones para la Ser-46 o para la Ile-47 fueron sustituidos por el codón indicado (subrayado).

Los fragmentos de la PCR de 1,4 kb resultantes que contenían los alelos *ptsH* (del codón 40) y la parte 5' del *ptsI* fueron digeridos con *HpaI* (el sitio *HpaI* presente en el gen *ptsH* antes del codón 46 se indica en cursiva en los cebadores anteriormente indicados) y con *SacI* y se utilizaron para sustituir el fragmento *HpaI/SacI* de 1,4 kb de tipo salvaje en pVMH1.

Con el fin de confirmar la presencia de las mutaciones, la secuencia de los alelos *ptsH* fue determinada en los cuatro plásmidos construidos. Para eliminar las mutaciones posiblemente introducidas en el gen *ptsI* por la amplificación PCR, el fragmento *BalI/SacI* de 1,35 kb de pVMH1 fue utilizado para sustituir el fragmento correspondiente en cada uno de los cuatro plásmidos que contenían los diversos alelos *ptsH*. Un único sitio *BalI* está presente 27 bp detrás del codón 46 del gen *ptsH* de *L. casei* en pVMH1 y en los derivados de pVMH1 que llevan los diferentes alelos *ptsH*.

Los cuatro plásmidos resultantes que llevaban los diversos alelos *ptsH* fueron denominados pVMH2, pVMH3, pVMH4 y pVMH5, respectivamente (Tabla 1), y fueron utilizados para transformar el mutante *ptsI* de *L. casei* BL126.

La Figura 2 es una presentación esquemática de los eventos de recombinación posibles durante la construcción de los mutantes *ptsH* con la cepa *ptsI1* BL126 y los plásmidos pVMH que contienen los diversos alelos *ptsH*. La integración de un plásmido pVMH que lleva una mutación en el gen *ptsH* (indicado por el círculo relleno) en el cromosoma de BL126 que lleva una mutación por cambio de marco de lectura en el gen *ptsI* (indicado por el triángulo relleno) por una recombinación tipo Campbell podría tener lugar en tres posiciones diferentes (antes de la mutación *ptsH*, entre las mutaciones *ptsH* y *ptsI* y después de la mutación *ptsI*) resultando en las tres disposiciones de ADN diferentes presentadas bajo el título: "1ª recombinación".

Los integrantes obtenidos mediante el primer (1) y el segundo (2) tipo de recombinación mostraron un fenotipo lac<sup>-</sup>, mientras que los integrantes obtenidos mediante el tercer tipo de recombinación (3) podrían fermentar la lactosa lentamente (probablemente debido a una poslectura a partir de un promotor situado en el plásmido).

Las tres disposiciones de ADN diferentes presentadas en la Figura 2 bajo el título: "2ª recombinación" se obtienen a partir de los integrantes de tipo 3 tras un segundo evento de recombinación que lleva a la escisión del plásmido

## ES 2 334 050 T3

pVMH. 3a proporciona una cepa lac<sup>-</sup> con una mutación por cambio de marco de lectura en *ptsI*; 3b proporciona una cepa de tipo salvaje (lac<sup>+</sup>), 3c proporciona el mutante *ptsH* deseado (lac<sup>+</sup>).

5 La transformación del mutante *ptsI* de *L. casei* BL126 con pVMH2, pVMH3, pVMH4 ó pVMH5 resultó en unos recombinantes resistentes a la eritromicina generados mediante la primera recombinación.

10 Los integrantes tipo 3 obtenidos con cada uno de los tres plásmidos pVMH se cultivaron durante 200 generaciones sin presión selectiva para permitir la segunda recombinación que llevaba a la escisión de los plásmidos pVMH. Por lo tanto, los clones sensibles a la eritromicina capaces de fermentar la lactosa fueron aislados.

15 Se obtuvieron dos tipos de recombinantes que fermentaban la lactosa y sensibles a la eritromicina que mostraban características de crecimiento ligeramente diferentes. Utilizando los cebadores adecuados, los alelos *ptsH* de dos clones de los recombinantes de crecimiento más lento y más rápido fueron amplificados por PCR y secuenciados. Para cada alelo *ptsH*, los dos clones de crecimiento más rápido contenían el gen *ptsH* de tipo salvaje, mientras que las cepas de crecimiento ligeramente más lento llevaban la mutación *ptsH* Ser-46-Ala (*ptsH1*, BL121), Ser-46-Thr (*ptsH2*, BL122) o Ile-47-Thr (*ptsH3*, BL123).

20 No se pudo obtener ninguna cepa que sintetizase el mutante Ser-46-Asp HPr con este método, aunque la amplificación PCR seguida por la secuenciación del ADN se llevó a cabo con quince clones sensibles a la eritromicina contruidos con el plásmido pVMH4.

### *Las mutaciones del gen ptsH perjudican al sistema CCR y al crecimiento diáuxico*

25 Con el fin de someter a ensayo el efecto de las diferentes sustituciones de aminoácidos en la HPr en diauxia, se comparó el comportamiento del crecimiento de los mutantes en un medio basal MRS suplementado con glucosa al 0,1% y lactosa al 0,2% con el de tipo salvaje y con un mutante *ccpA*.

30 La Figura 3 representa el comportamiento del crecimiento de la *L. casei* de tipo salvaje y de las cepas mutantes *ccpA* y *ptsH* en un medio basal MRS que contenía glucosa al 0,1% y lactosa al 0,2%. Los símbolos representan: círculos rellenos, BL23 de tipo salvaje; cuadrados rellenos, mutante *ccpA* BL71; círculos vacíos, mutante *ptsH* BL121; triángulos rellenos, mutante *ptsH2* BL122; triángulos vacíos, mutante *ptsH3* BL123.

35 Como se ha demostrado anteriormente [VEYRAT *et al.*, Microbiology, 140, 1141-1149. (1994); GOSALBES *et al.*, FEMS Microbiol. Lett., 148, 83-89. (1997); GOSALBES *et al.*, J. Bacteriol., 181, 3928-3934, (1999)], la cepa de tipo salvaje de *L. casei* mostró un crecimiento diáuxico fuerte en presencia de estos dos azúcares con una etapa de reposo de aproximadamente 15 horas que separaba las etapas de crecimiento en glucosa y en lactosa, mientras que en la cepa mutante del gen *ccpA* esta etapa de reposo se redujo a 5 horas. El crecimiento diáuxico observado con el mutante *ptsHS46T* resultó muy similar al de la cepa de tipo salvaje. En cambio, la etapa de reposo fue solo de aproximadamente 6 horas para el mutante *ptsHS46A* y para el *ptsHI47T* estuvo entre la de tipo salvaje y la del mutante *ptsHS46A* (10 h).

40 Se encontró una gradación similar cuando se investigó la liberación de la represión mediada por glucosa de la actividad N-acetilglucosaminidasa.

45 Para los ensayos de N-acetilglucosaminidasa, se prepararon células de *L. casei* permeabilizadas siguiendo un método descrito previamente [CHASSY y THOMPSON, J. Bacteriol., 154, 1195-1203, (1983)]. Los ensayos de N-acetilglucosaminidasa se llevaron a cabo a una temperatura de 37°C en un volumen de 250  $\mu$ l que contenía fosfato de potasio 10 mM, pH 6,8, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, P-nitrofenil N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida 5 mM (SIGMA) y 5  $\mu$ l de células permeabilizadas. La reacción se detuvo con 250  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 5% y se midió el OD<sub>420</sub>. Se determinaron las concentraciones de proteínas con EL ensayo de fijación de colorante o "dye binding" de BIO-RAD.

55 La Figura 4 muestra el efecto de las diversas mutaciones *ptsH* en el CCR de la N-acetilglucosaminidasa. Se presentan las actividades de la N-acetilglucosaminidasa expresadas en nmoles de producto formado por minuto y mg de proteína y determinadas en la *L. casei* de tipo salvaje (wt) y las cepas mutantes *ccpA*, *ptsH1* (S46A), *ptsH2* (S46T) y *ptsH3* (I47T) cultivadas en medio basal MRS que contenía glucosa o ribosa al 0,5%.

60 Mientras que la alta actividad de esta enzima se puede medir en las células de tipo salvaje cultivadas en ribosa, se descubrió que la inhibición de la actividad de la glucosa era aproximadamente 10 veces mayor. De manera similar que en el mutante *ccpA*, el efecto represivo de la glucosa en la N-acetilglucosaminidasa había desaparecido completamente en el mutante *ptsHS46A*. La inhibición de la actividad N-acetilglucosaminidasa por la presencia de glucosa en el medio de cultivo resultó también claramente disminuida en los otros dos mutantes *ptsH* (aproximadamente una inhibición 2 veces mayor en el mutante *ptsHI47T* y una inhibición 2,5 veces mayor en el mutante *ptsHS96T*), lo que confirmaba la importancia de la fosforilación de la Ser-46 de la HPr y de los aminoácidos de alrededor de la Ser-46 para el sistema CCR en *L. casei*.

65 Por lo tanto, estos dos ensayos indicaron que había una pérdida notable y progresiva de la represión por catabolitos en los diferentes mutantes: tipo salvaje < *ptsH2* < *ptsH3* < *ptsH1* < *ccpA*.

*Las mutaciones del gen ptsH perjudican la exclusión del inductor en L. casei*

5 Cuando se cultivaron las células de *L. casei* de tipo salvaje en un medio que contenía glucosa y bien ribosa o maltosa, se observó un comportamiento del crecimiento diáuxico similar al obtenido con las células que crecían en presencia de glucosa y lactosa. Sin embargo, mientras que el tiempo de reposo del crecimiento diáuxico en presencia de glucosa y lactosa no sólo se redujo parcialmente en los mutantes *ptsH*, el crecimiento diáuxico desapareció completamente cuando se cultivaron las cepas *ptsH* en un medio que contenía glucosa y bien maltosa o ribosa. Estos resultados sugerían que la fosforilación de la HPr en la Ser-46 juega un papel importante en la regulación de la utilización de estos dos azúcares no PTS por *L. casei*.

10 Con el fin de distinguir si este efecto era mediado por la interacción del complejo CcpA/P-Ser-HPr con secuencias *cre* o por la interacción de P-Ser-HPr con una permeasa de azúcar según el mecanismo propuesto de exclusión del inductor [YE *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 3102-3106, (1994); YE *et al.*, J. Bacteriol., 176, 3484-3492, (1994); YE y SAIER, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 417-421, (1995); YE y SAIER, J. Bacteriol., 177, 1900-1902, (1995)], se llevaron a cabo experimentos de transporte de azúcares.

20 Se cultivaron las células hasta la mitad de la etapa del crecimiento exponencial en medio de fermentación MRS ambos conteniendo un 0,5% de los azúcares indicados. Posteriormente, se añadió glucosa a una concentración final de 0,5% y se cultivaron las células durante 30 minutos más para permitir la síntesis de las proteínas de transporte PTS específicas para glucosa. Se lavaron las células dos veces con tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 7, que contenía MgCl<sub>2</sub> 10 mM y se resuspendió en tampón Tris maleato 50 mM, pH 7,2, que contenía MgCl<sub>2</sub> 5 mM. Se llevaron a cabo ensayos de transporte en 1 ml de este último tampón que contenía peptona al 1% y 0,6 mg de células (peso en seco). Se preincubaron las muestras durante 5 minutos a 37°C antes de añadir azúcares marcados con [<sup>14</sup>C] (0,5 mCi/mmol, ISOTOPCHIM, Ganagobie-Peyruis, Francia) hasta una concentración final de 1 mM. Se retiraron muestras de 100 µl a diferentes intervalos de tiempo, se filtraron rápidamente a través de filtros con poros de un tamaño de 0,45 µm, se lavaron dos veces con 5 ml de tampón Tris maleato frío y se determinó la radiactividad retenida mediante conteo por escintilación en líquido.

30 La Figura 5 muestra el efecto de la glucosa y de la 2-deoxi-D-glucosa en la absorción de la maltosa y de la ribosa por las células de tipo salvaje y por las células mutantes *ptsH*. Se midió el transporte de la ribosa por la cepa BL23 de tipo salvaje de *L. casei* en ausencia y en presencia de glucosa y de 2-deoxi-D-glucosa (A). Se determinó el transporte de la maltosa en ausencia y en presencia de glucosa o de 2-deoxi-D-glucosa en la cepa BL23 de tipo salvaje de *L. casei* (B), el mutante *ptsH1* BL121 (C), el mutante *ptsH2* BL122 (D), el mutante *ptsH3* BL123 (E) y el mutante *ptsI* BL126 (F). Los símbolos representan: cuadrados, absorción de ribosa o maltosa en ausencia de otros azúcares; rombos, absorción de ribosa o maltosa con glucosa (concentración final de 10 mM) añadido tras 10 ó 14 minutos, respectivamente; círculos, absorción de ribosa o maltosa con 2-deoxi-D-glucosa (concentración final de 10 mM) añadido tras 10 ó 14 minutos, respectivamente; triángulos, las células fueron incubadas durante 10 minutos en presencia de glucosa 20 mM antes de que empezara la reacción de absorción de la maltosa.

40 En la Figura 5A se muestra la absorción de ribosa por las células de tipo salvaje de *L. casei* cultivadas en ribosa. La adición de glucosa a las células de tipo salvaje que transportaban la ribosa no causó inhibición de la absorción de ribosa sino que aumentó el transporte aproximadamente cuatro veces. La adición del análogo de la glucosa 2-deoxi-D-glucosa suprimió completamente la absorción de ribosa. Lo más probable es que la escasez de energía causada por el transporte y la acumulación del análogo de la glucosa no metabolizable sea responsable del efecto inhibitorio de la 2-deoxi-D-glucosa en el transporte de la ribosa.

50 A diferencia del efecto estimulador ejercido por la glucosa en la absorción de ribosa, se descubrió que el transporte de la maltosa era detenido instantáneamente cuando se añadía glucosa o 2-deoxiglucosa a las células de tipo salvaje de *L. casei* que transportaban la maltosa. La absorción de la maltosa era también suprimida completamente cuando se añadía glucosa o 2-deoxiglucosa a la suspensión de células 10 minutos antes de la adición de la maltosa (Fig. 5B). El mutante *ptsH1* (S46AHP) mostró un comportamiento completamente diferente al de la cepa de tipo salvaje (Fig. 5C). La absorción de la maltosa en esta cepa fue ligeramente superior, y la adición de glucosa provocó un aumento adicional de la velocidad de transporte de la maltosa. Se descubrió un efecto estimulador similar pero menos pronunciado de la glucosa en el transporte de la maltosa para el mutante *ptsH2* (S46THPr) (Fig. 5D), mientras que no se observó ningún cambio en la velocidad de transporte de la maltosa que seguía a la adición de la glucosa para el mutante *ptsH3* (I47THPr) (Fig. 5E). En el mutante *ptsI* BL126, que es incapaz de transportar glucosa y 2-deoxi-D-glucosa mediante el sistema PTS, la presencia de glucosa no ejercía ningún efecto inhibitorio en la absorción de la maltosa (Fig. 5F).

60 La medición de la absorción de la glucosa en el mutante *ptsI* BL126 muestra que la glucosa es transportada 10 veces más lentamente que en la cepa de tipo salvaje (datos no mostrados). Lo más probable es que una absorción de la glucosa más lenta y el metabolismo sean los responsables del fallo de la glucosa para conseguir la exclusión del inductor en la cepa mutante *ptsI*. En cambio, en una cepa mutante *ccpA*, la glucosa ejerce un efecto inhibitorio en la absorción de la maltosa idéntico al observado con la cepa de tipo salvaje. Este resultado establece claramente que el CcpA no está implicado en la exclusión de la maltosa activada por glucosa.

65 Para asegurar que cultivar las células durante 30 minutos en un medio con glucosa no tenía un efecto drástico en la expresión de los genes de la maltosa, se llevaron a cabo experimentos de exclusión del inductor con células que no habían sido expuestas a la glucosa. En estas condiciones, la adición de glucosa a las células que transportan maltosa

ejerce un fuerte efecto inhibitorio en la absorción de la maltosa en las cepas de tipo salvaje y en las cepas mutantes *ccpA*, aunque la maltosa continúa siendo absorbida lentamente por estas células tras la adición de la glucosa. En cambio, la presencia de glucosa detiene completamente la absorción de maltosa por las células que han sido cultivadas en glucosa durante 30 minutos. Sin embargo, con los mutantes *ptsH1*, *ptsH2* y *ptsH3* cultivados sólo en maltosa, la glucosa no ejerce ningún efecto inhibitorio en la absorción de la maltosa, estableciendo claramente que el fallo de la glucosa en inhibir el transporte de maltosa en las cepas mutantes *ptsH* no está relacionado con el precrecimiento de las células en un medio con glucosa.

La inhibición en el transporte de la maltosa observada podría haberse debido a la elevada secreción de productos de fermentación de la maltosa cuando se añadía la glucosa a las células de tipo salvaje. En los mutantes *ptsH*, este efecto de la glucosa podría haber sido menos pronunciado. Para excluir esta posibilidad, los investigadores también midieron el consumo de azúcar restando las células que habían sido cultivadas en maltosa y durante los últimos 30 minutos antes de recoger las células en maltosa y glucosa. Con el fin de hacer seguimiento del consumo de azúcar por las cepas de tipo salvaje de *L. casei* y por las cepas mutantes *ptsH1*, se cultivaron las células y se recogieron como se ha descrito para los estudios de transporte y se resuspendieron 18 mg de células (peso en seco) en 5 ml de tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7. Después de una incubación de 5 minutos a 37°C, se añadieron maltosa y glucosa a una concentración final de 0,04% y 0,2%, respectivamente. Se retiraron muestras de 300 µl a diferentes intervalos de tiempo, se hicieron hervir durante 10 minutos y se aclararon por centrifugación. Se determinó el contenido de azúcar del sobrenadante con un ensayo espectrofotométrico acoplado utilizando  $\alpha$ -glucosidasa y hexoquinasa/glucosa-6-P deshidrogenasa como recomienda el proveedor (BOEHRINGER-MANNHEIM, Alemania).

La Figura 6 muestra el consumo de maltosa restando las células de la cepa BL23 de tipo salvaje de *L. casei* y los mutantes *ptsH1* BL121 en presencia o en ausencia de glucosa. Los símbolos representan: cuadrados, concentración de maltosa en el medio en los experimentos sin glucosa; rombos, concentración de maltosa y círculos concentración de glucosa en el medio cuando se añadió glucosa tres minutos después de haber empezado el experimento.

Los resultados presentados en la Figura 6A confirman que la maltosa no es utilizada en presencia de glucosa por las células de tipo salvaje de *L. casei*. El consumo de maltosa cesó inmediatamente cuando se añadió la glucosa y la concentración de maltosa se mantuvo constante en el medio mientras la glucosa estuvo presente. El consumo de maltosa se reinició sólo cuando la glucosa había desaparecido completamente del medio. En cambio, la adición de glucosa a las células mutantes *ptsH1* que absorbían maltosa provocó sólo una inhibición transitoria corta del consumo de maltosa, que fue seguida de la utilización simultánea de ambos azúcares (Fig. 6B). La absorción reducida de la glucosa por el mutante *ptsH1* no parece ser responsable de la ausencia del efecto inhibitorio de la glucosa, ya que en esta cepa la glucosa se utilizaba ligeramente más rápidamente en comparación con la cepa de tipo salvaje. Estos resultados sugieren que la fosforilación de la Ser-46 en la HPr es necesaria para la exclusión de la maltosa de las células de *L. casei* por la glucosa y probablemente otras fuentes de carbono de metabolización rápida y que la P-Ser-HPr juega un papel importante en el fenómeno de regulación denominado exclusión del inductor [YE *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 3102-3106, (1994); YE *et al.*, J. Bacteriol., 176, 3484-3492, (1994); YE y SAIER, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 417-421, (1995); YE y SAIER, J. Bacteriol., 177, 1900-1902, (1995)].

### Ejemplo 3

#### *Construcción y caracterización de mutantes ptsI aptos para uso alimentario*

Los mutantes aptos para uso alimentario del gen *ptsI* fueron construidos en la cepa industrial de la *L. paracasei*, subespecie *paracasei* CNCM I-1518; esta cepa se da a conocer en EP 0 794 707.

#### *Construcción de un mutante ptsI*

Este mutante se construyó utilizando el método del Ejemplo 2.

El plásmido pVMR10 se utilizó para transformar *L. casei* CNCM I-1518.

La cepa transformada fue cultivada en medio MRS que comprende 5 µg/ml de eritromicina. Se aisló un integrante *ptsI*<sup>r</sup> resistente a la eritromicina. Este integrante se cultivó durante 200 generaciones en medio MRS sin eritromicina para permitir la segunda recombinación que lleva a la escisión del plásmido pVMR10.

Se aisló un clon Lac<sup>-</sup> sensible a la eritromicina, tal como se explica anteriormente en el Ejemplo 2, se comprobó mediante PCR y se secuenció su gen *ptsI*. El patrón de fermentación de este clon en API-CH50L mostró que, cuando se compara con el tipo salvaje CNCM I-1518, este mutante ya no podía utilizar adonitol, fructosa, manosa, sorbosa, manitol, sorbitol, amígdalina, arbutina, salicina, cellobiosa, sucrosa ni trehalosa.

Este mutante se cultivó a 37°C en leche semidesnatada (13 g grasa/kg) o leche desnatada. En leche desnatada, se alcanzó un pH de 4,45 después de 34 horas (bajo las mismas condiciones se alcanzó un pH de 4,45 después de 30 horas con la cepa de tipo salvaje CNCM I-1518).

## ES 2 334 050 T3

En otra serie de ensayos, se utilizó leche estandarizada con 170 gramos de proteína/kg, 13 gramos de grasa/kg y suplementada con 50 gramos de glucosa/kg.

5 Los productos fermentados obtenidos a partir de leche estandarizada suplementada con glucosa con la cepa mutante *ptsI* presentan una fuerza de gel inferior en aproximadamente un 15% a un 25% que los productos fermentados obtenidos a partir de la cepa de tipo salvaje. Esto permite obtener un gel más elástico, en aproximadamente 15% a un 25%, y reducir la sinéresis.

10 También presentan una viscosidad ligeramente menor que los productos fermentados obtenidos con la cepa de tipo salvaje. Sin embargo, la pérdida de viscosidad bajo condiciones de cizallamiento es menos importante en el caso de los productos obtenidos con la cepa mutante. Esta propiedad permite una mejor conservación de la textura durante los procesos industriales en los que pueden ocurrir cizallamientos, tales como la preparación de leche fermentada agitada.

15 Los productos fermentados obtenidos con la cepa mutante presentaban un sabor más cremoso que los productos fermentados obtenidos con la cepa de tipo salvaje. Esto está relacionado con un mayor contenido de ácidos grasos C4, C6, C8, C12, C14 y C16.

### 20 Referencias citadas en la descripción

*Esta lista de referencias citadas por el solicitante es solamente para conveniencia del lector. La misma no forma parte del documento de patente europea. A pesar de que se ha tenido mucho cuidado durante la recopilación de las referencias, no deben excluirse errores u omisiones y a este respecto la OEP se exime de toda responsabilidad.*

### 25 Documentos de patente citados en la descripción

- EP 0794707 A
- EP 00400894 A

### Literatura (no patentes) citada en la descripción

- 30
- MORI *et al. Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, vol. 47, 54-57
  - CHARRIER *et al. J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 14166-14174
  - 35 • TORTOSA *et al. J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 17230-17237
  - STÜLKE *et al. Mol. Microbiol.*, 1998, vol. 28, 865-874
  - 40 • LINDNER *et al. Mol. Microbiol.*, 1999, vol. 31, 995-1006
  - DEUTSCHER *et al. J. Bacteriol.*, 1993, vol. 175, 3730-3733
  - KRÜGER *et al. J. Bacteriol.*, 1996, vol. 178, 2637-2644
  - 45 • MARTIN-VERSTRAETE *et al. Mol. Microbiol.*, 1998, vol. 28, 293-303
  - GALINIER *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 1823-1828
  - 50 • REIZER *et al. Mol. Microbiol.*, 1998, vol. 27, 1157-1169
  - BROCHU; VADEBONCOEUR. *J. Bacteriol.*, 1999, vol. 181, 709-717
  - KRAVANJA *et al. Mol. Microbiol.*, 1999, vol. 31, 59-66
  - 55 • DEUTSCHER *et al. Biochemistry*, 1986, vol. 25, 6543-6551
  - DEUTSCHER *et al. Mol. Microbiol.*, 1997, vol. 42, 171-178
  - 60 • HENKIN *et al. Mol. Microbiol.*, 1991, vol. 5, 575-584
  - FUJITA; MIWA. *J. Bacteriol.*, 1994, vol. 176, 511-513
  - GÖSSERINGER *et al. J. Mol. Biol.*, 1997, vol. 266, 665-676
  - 65 • KIM *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 9590-9595
  - GALINIER *et al. J. Mol. Biol.*, 1999, vol. 286, 307-314

## ES 2 334 050 T3

- **MARTIN-VERSTRAETE** *et al. Mol. Microbiol.*, 1999, vol. 28, 293-303
- **HUECK** *et al. Res. Microbiol.*, 1994, vol. 145, 503-518
- 5 • **GOSALBES** *et al. J. Bacteriol.*, 1999, vol. 181, 3928-3934
- **MONEDERO** *et al. J. Bacteriol.*, 1997, vol. 179, 6657-6664
- **POTER; CHASSY**. *Gene*, 1988, vol. 62, 263-276
- 10 • **ALPERT; CHASSY**. *Gene*, 1988, vol. 62, 277-288
- **ALPERT; CHASSY**. *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265, 22561-22568
- 15 • **ALPERT; SIEBERS**. *J. Bacteriol.*, 1997, vol. 179, 1555-1562
- **POSNO** *et al. Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, vol. 57, 1822-1828
- **HENGSTENBERG** *et al. J. Bacteriol.*, 1969, vol. 99, 383-388
- 20 • **GALINIER** *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, vol. 94, 8439-8444
- **ROOSSIEN** *et al. Biochim. Biophys. Acta.*, 1983, vol. 760, 185-187
- 25 • **LAEMMLI**. *Nature*, 1970, vol. 227, 680-685
- **LELOUP** *et al. Appl. Environm. Microbiol.*, 1997, vol. 63, 2117-2123
- **DAVIS; HENDERSON**. *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 13928-13932
- 30 • **PAO** *et al. Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998, vol. 62, 1-34
- **VEYRAT** *et al. Microbiology*, 1994, vol. 140, 1141-1149
- 35 • **GOSALBES** *et al. FEMS Microbiol. Lett.*, 1997, vol. 148, 83-89
- **CHASSY; THOMPSON**. *J. Bacteriol.*, 1983, vol. 154, 1195-1203
- **YE** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 3102-3106
- 40 • **YE** *et al. J. Bacteriol.*, 1994, vol. 176, 3484-3492
- **YE; SAIER**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, 417-421
- 45 • **YE; SAIER**. *J. Bacteriol.*, 1995, vol. 177, 1900-1902

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de un mutante de *L. casei* que presenta por lo menos una mutación en el gen *ptsH*, en la que dicha mutación perjudica la regulación de un mecanismo de represión catabólica por carbono (CCR) que implica la proteína PTS HPr, para la preparación de un producto alimentario.

10 2. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho mutante presenta por lo menos una mutación seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- cualquier mutación en el gen *ptsH* que perjudica la capacidad de HPr de ser fosforilada en la His-15, o de fosforilar la EIIA; y
- 15 - cualquier mutación en el gen *ptsH*, que perjudica la capacidad de HPr de ser fosforilada en la Ser-46.

20 3. Utilización según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho mutante se selecciona de entre el grupo que consiste en mutantes del gen *ptsH* que presentan por lo menos una mutación que resulta en la expresión de una HPr que presenta por lo menos una sustitución de un aminoácido en la posición 15 y/o en la posición 46 y/o en la posición 47 de la HPr de tipo salvaje, y/o por lo menos una mutación que resulta en la expresión de una HPr delecionada de por lo menos uno de los aminoácidos 15, 46 y/o 47 de la HPr de tipo salvaje.

25 4. Mutante de *L. casei* que presenta por lo menos una mutación en por lo menos el gen *ptsH*, en el que dicha mutación perjudica por lo menos una de las funciones del producto de dicho gen.

5. Mutante de *L. casei* apto para uso alimentario, que presenta por lo menos una mutación en el gen *ptsH*, en el que dicha mutación perjudica por lo menos una de las funciones del producto de dicho gen.

30 6. Método para la obtención de un mutante apto para el uso alimentario según la reivindicación 5, donde dicho método comprende:

- 35 - transformar la *L. casei* con un vector integrativo que comprende un gen *ptsH* mutado, en el que dicha mutación perjudica por lo menos una de las funciones del producto de dicho gen y que comprende, además, un gen marcador selectivo;
- cultivar las bacterias bajo condiciones selectivas para el gen marcador con el fin de obtener las bacterias que han integrado el plásmido en su cromosoma mediante un evento de recombinación simple;
- 40 - cultivar dichas bacterias bajo condiciones no selectivas para el gen marcador con el fin de obtener bacterias que han experimentado un evento de recombinación doble que lleva a la escisión de las secuencias del vector.

45 7. Método para la obtención de un mutante apto para el uso alimentario de *L. casei* en el que la función catalítica de la HPr se encuentra sólo ligeramente perjudicada, donde dicho método comprende:

- 50 - proporcionar una cepa mutante de *L. casei* en la que el gen *ptsI* se encuentra inactivado de tal manera que la función de la EI se encuentra totalmente perjudicada;
- transformar dicha cepa mutante con un vector integrativo que comprende un operón *ptsHI* que consiste en un gen *ptsI* de tipo salvaje y un gen *ptsH* mutante, y que comprende adicionalmente un gen marcador selectivo;
- 55 - cultivar las bacterias en lactosa bajo condiciones selectivas para el gen marcador, y recuperar las bacterias que han integrado el vector en su cromosoma mediante un evento de recombinación simple;
- 60 - cultivar las bacterias seleccionadas en lactosa y bajo condiciones no selectivas para el gen marcador con el fin de obtener bacterias que han experimentado un evento de recombinación doble que lleva a la escisión de las secuencias del vector.

65 8. Proceso para la preparación de un producto alimentario o un aditivo alimentario en el que dicho proceso comprende la fermentación de un sustrato alimentario con un mutante de *L. casei*, tal como se ha definido en las reivindicaciones 1 a 5.

9. Proceso según la reivindicación 8, en el que dicho producto alimentario es un producto láctico.

## ES 2 334 050 T3

10. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, para la preparación de un producto alimentario enriquecido con compuestos de aroma, que comprende la fermentación de un sustrato alimentario con una cepa de *L. casei* tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

5 11. Producto alimentario fermentado que comprende por lo menos un mutante de *L. casei*, tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

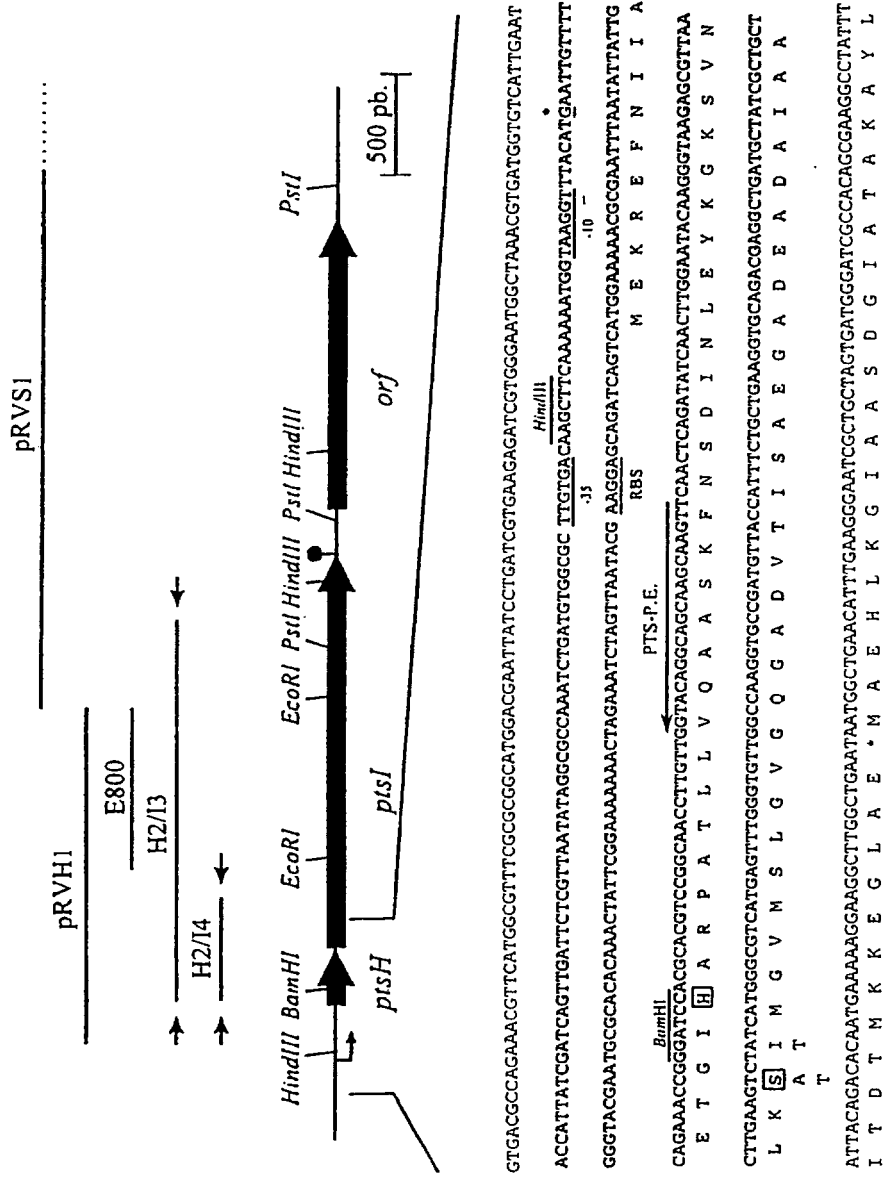
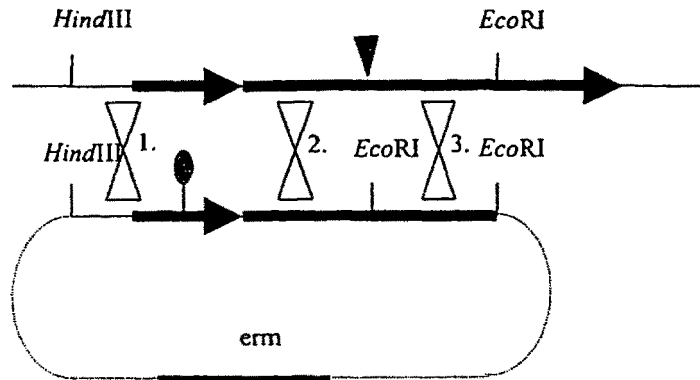
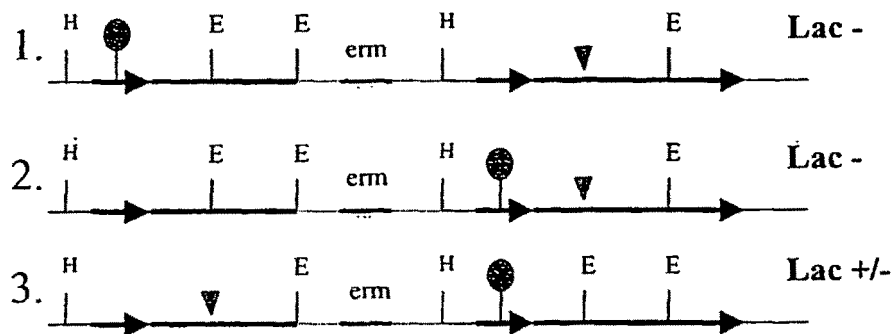


Figura 1



1ª recombinación



2ª recombinación

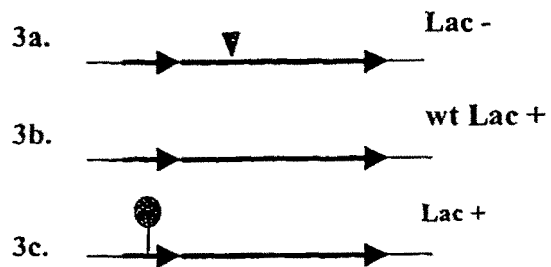


Figura 2

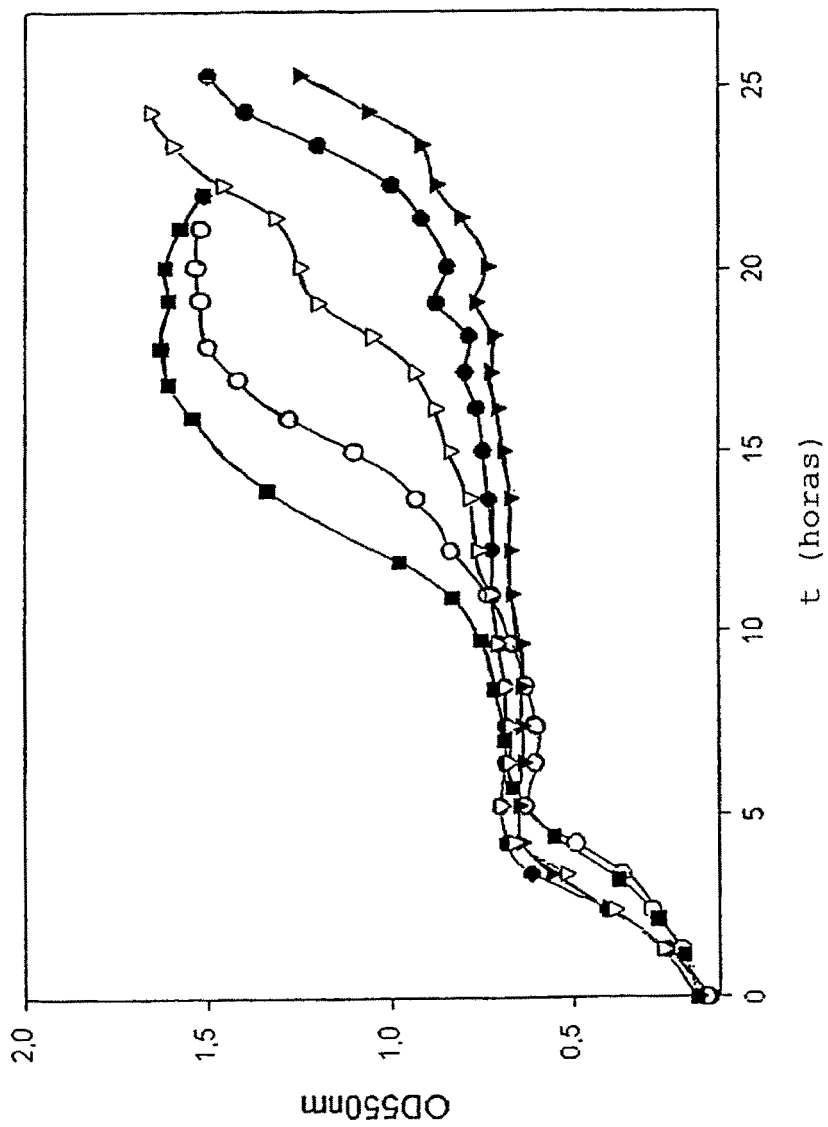


Figura 3

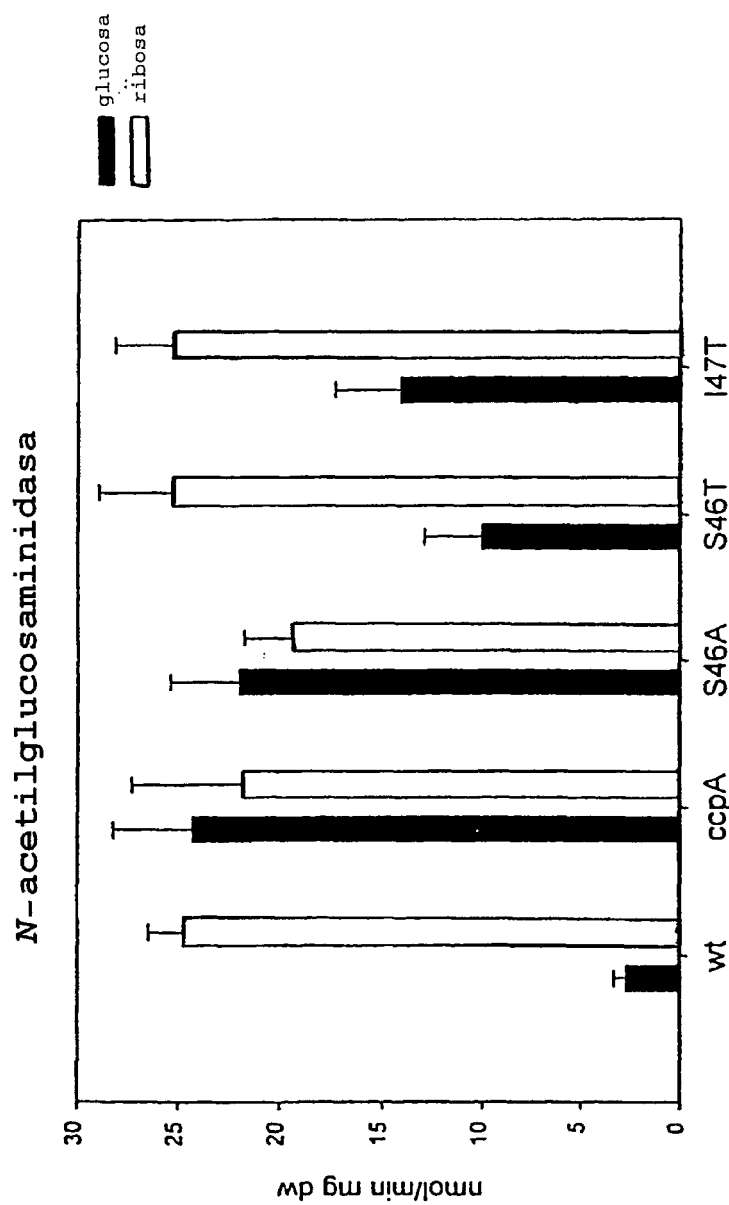


Figura 4

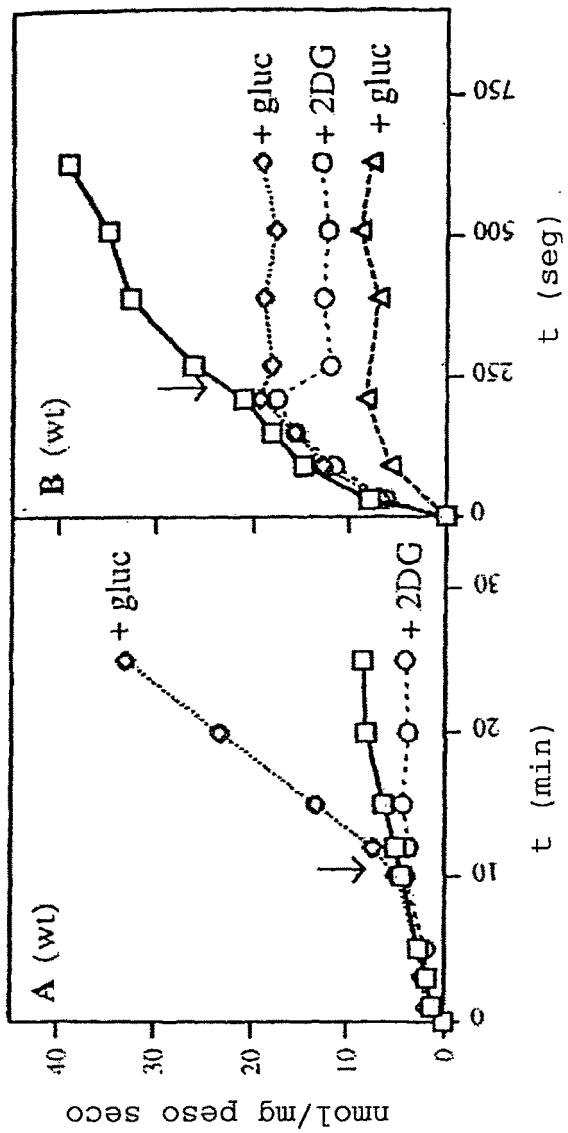


Figure 5A

Figure 5B

Figure 5

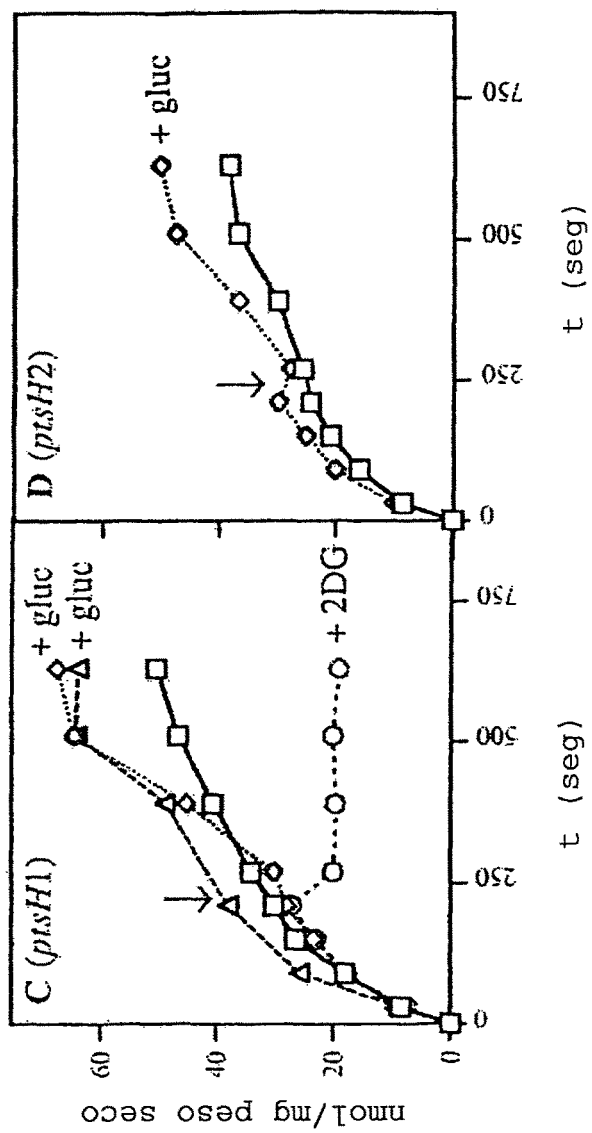


Figure 5D

Figure 5C

Figure 5 (cont)

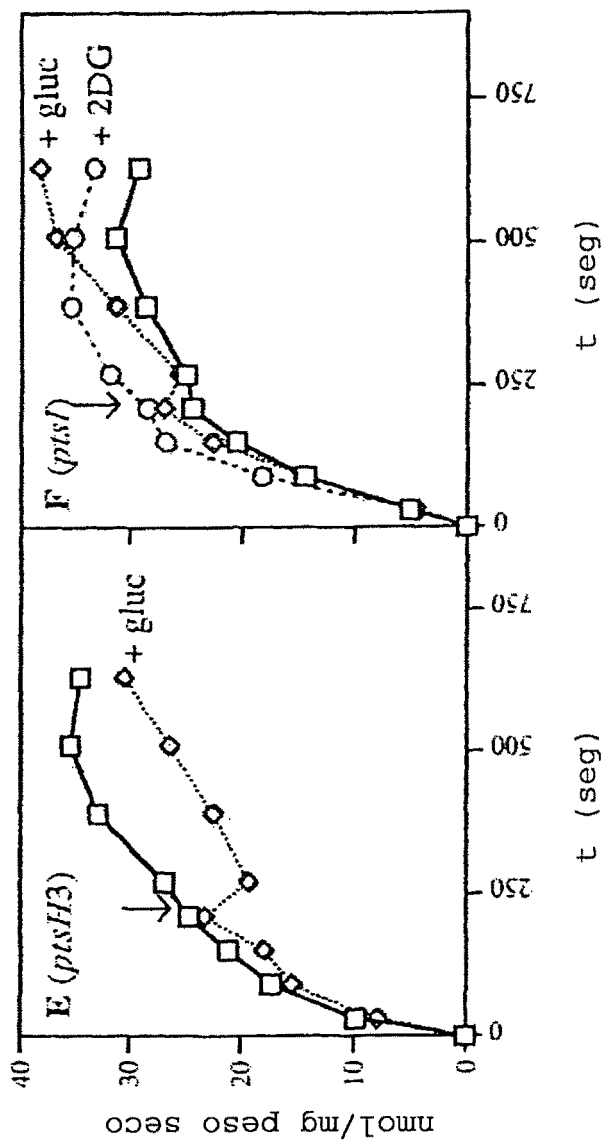


Figure 5E

Figure 5F

Figure 5 (cont.)

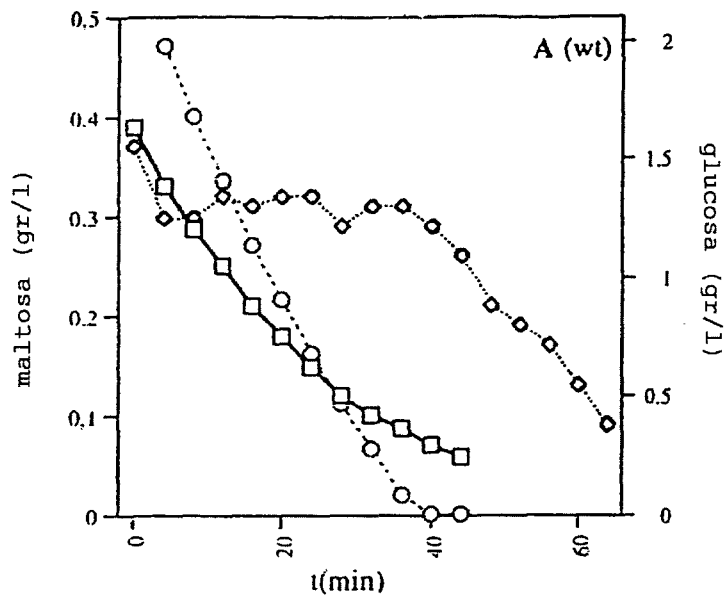


Figura 6A

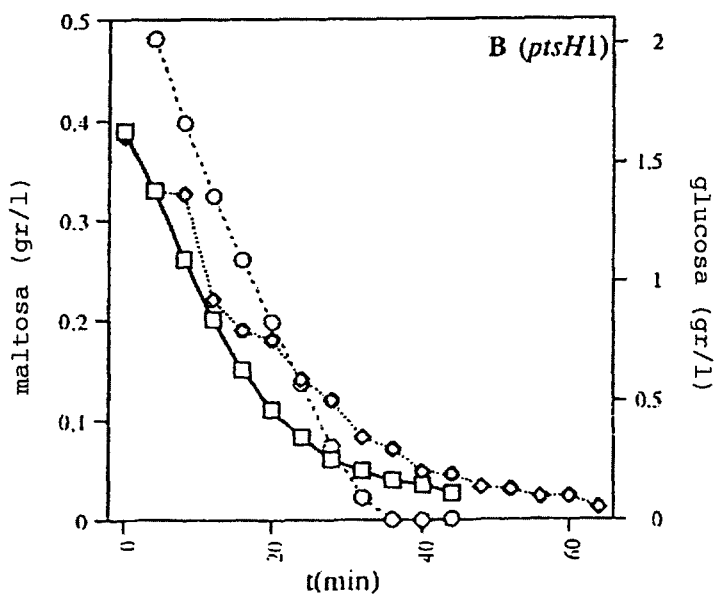


Figura 6B

Figura 6

# ES 2 334 050 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CNRS  
CSIC  
5 COMPAGNIE GERVAIS DANONE  
DEUTSCHER, Josef  
PEREZ MARTINEZ, Gaspar  
MONEDERO GARCIA, Vicente  
10 VIANA BALLESTER, Rosa  
BENBADIS, Laurent  
PIERSON, Anne  
FAURIE, Jean-Michel
- 15 <120> MUTANTES DE *LACTOBACILUS CASEI* CON REGULACIÓN DEFECTUOSA DEL CATABOLISMO  
DEL CARBONO
- <130> MJPcb191-171
- 20 <140>  
<141>
- <150> EP 00400894.2  
25 <151> 2000-03-31
- <160> 3
- 30 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1  
<211> 4150  
35 <212> ADN  
<213> *Lactobacillus casei*
- 40 <220>  
<221> CDS  
<222> (273)..(536)  
<223> Producto: Hpr
- 45 <220>  
<221> CDS  
<222> (539)..(2263)  
50 <223> Producto: Enzima I

55

60

65



ES 2 334 050 T3

gct aag ttc aag cag gat gct gaa gca ttt gct aag caa aaa gct gaa 1300  
Ala Lys Phe Lys Gln Asp Ala Glu Ala Phe Ala Lys Gln Lys Ala Glu  
330 335 340

5 tgg gct ctt ttg aag acg gcc aaa tca atc aca gct gat ggc aaa cac 1348  
Trp Ala Leu Lys Thr Ala Lys Ser Ile Thr Ala Asp Gly Lys His  
345 350 355

10 ttt gat gtt gct gcc aac atc ggc acg cca aag gat ctt gat ggt gtg 1396  
Phe Asp Val Ala Ala Asn Ile Gly Thr Pro Lys Asp Leu Asp Gly Val  
360 365 370

15 ctg gca aac ggt gct gaa ggt atc ggt ttg tat cgg aca gag ttc ttg 1444  
Leu Ala Asn Gly Ala Glu Gly Ile Gly Leu Tyr Arg Thr Glu Phe Leu  
375 380 385 390

20 tac atg gat tct gct gaa tta ccg acc gaa gac gat caa ttc gag gcc 1492  
Tyr Met Asp Ser Ala Glu Leu Pro Thr Glu Asp Asp Gln Phe Glu Ala  
395 400 405

25 acg atg gat att ggt ggg gat aaa cat ctg cca tat ttg cca ctt cct 1588  
Thr Met Asp Ile Gly Gly Asp Lys His Leu Pro Tyr Leu Pro Leu Pro  
425 430 435

30 gaa gaa cag aac cca ttc ttg ggt tat cgt gcg att cgg atc agt ctt 1636  
Glu Glu Gln Asn Pro Phe Leu Gly Tyr Arg Ala Ile Arg Ile Ser Leu  
440 445 450

35 gat cgc caa gat atc ttc cgg aca cag ttg cgc gcc ttg ttg cgt gca 1684  
Asp Arg Gln Asp Ile Phe Arg Thr Gln Leu Arg Ala Leu Leu Arg Ala  
455 460 465 470

40 tct gcc ttt ggc aat ctg cgg atc atg ttc cct atg att gct acc att 1732  
Ser Ala Phe Gly Asn Leu Arg Ile Met Phe Pro Met Ile Ala Thr Ile  
475 480 485

45 gct gaa ttc aag caa gca agg cag att ttc act gaa gaa aaa gat aag 1780  
Ala Glu Phe Lys Gln Ala Arg Gln Ile Phe Thr Glu Glu Lys Asp Lys  
490 495 500

50 tta gtc aag gat ggc gtc aaa gta tct gat gat atc caa ctt ggc att 1828  
Leu Val Lys Asp Gly Val Lys Val Ser Asp Asp Ile Gln Leu Gly Ile  
505 510 515

55 atg atc gaa att cct gca gct gca gtt ttg gct gat cag ttt gct aag 1876  
Met Ile Glu Ile Pro Ala Ala Ala Val Leu Ala Asp Gln Phe Ala Lys  
520 525 530

60 tat gtt gac ttc ttc tcc att ggt aca aat gac ttg atc cag tac tct 1924  
Tyr Val Asp Phe Phe Ser Ile Gly Thr Asn Asp Leu Ile Gln Tyr Ser  
535 540 545 550

65 atg gcc gct gat cgt ggg aac gag cat gtt tcc tac ctg tat cag cca 1972  
Met Ala Ala Asp Arg Gly Asn Glu His Val Ser Tyr Leu Tyr Gln Pro  
555 560 565

70 tac aac cca tcc atc ctt cgc cta atc aag cac gtg att gat tcg gca 2020  
Tyr Asn Pro Ser Ile Leu Arg Leu Ile Lys His Val Ile Asp Ser Ala  
570 575 580

75 cat aag gaa ggc aag tgg gcc ggt atg tgt ggc gaa gct gct ggt gat 2068  
His Lys Glu Gly Lys Trp Ala Gly Met Cys Gly Glu Ala Ala Gly Asp  
585 590 595

# ES 2 334 050 T3

```

cca atc atg gta cca ctg ttg ctt ggt atg ggt ctt gac gaa tac tca 2116
Pro Ile Met Val Pro Leu Leu Leu Gly Met Gly Leu Asp Glu Tyr Ser
600 605 610

5   atg tcc gca act tct gtc ctt aaa gta cgc agc ttg atg aag aag ctt 2164
Met Ser Ala Thr Ser Val Leu Lys Val Arg Ser Leu Met Lys Lys Leu
615 620 625 630

10  tcg aca gct gat atg gct aag atg gac gaa att gct ttg aac caa aat 2212
Ser Thr Ala Asp Met Ala Lys Met Asp Glu Ile Ala Leu Asn Gln Asn
635 640 645

15  atc act aat gat gaa aac gct gat ctg gtt aag aaa aca act ggt cag 2260
Ile Thr Asn Asp Glu Asn Ala Asp Leu Val Lys Lys Thr Thr Gly Gln
650 655 660

15  aaa taaactttca ttatcagaaa gagtctattg actgaataag ttgacggcctt 2313
Lys

ctttttttga ccaaaatttg attttgatcg tgctcgctag cattgatttt tctgaaacct 2373

20  gctcgaanaat gggactttat ctttgccatg caaaaagggtg attgcgcgac tatttgctcg 2433
catctgaaca gtgactgact gcagactttt cagaaaagtg ttaaggttat tatgtaaact 2493
aaaaattgag ttactgattc atggtatggc actgtgagcg gtggttcatt tggacttgta 2553
gggggaattg catgtatcaa tcaaaaacac acaatcatcg atttaccggt caccttgca 2613

25  gtgcgaagac acggttgccg ctagtagcat tgatttcaac gatgggtggc ctgctttttg 2673
gctatgacac tggggtgatc aatggcgcat tgctttttat ttcttcggaa ctgaaacttg 2733
cccctggatc acagggttgg gtcaccagta gcttgacgct gggtgctgct tttggtgcta 2793

30  tcttagtcgg tcgtttaagt gatcgtatg ggcgcaggcg gctcatcacc atgtagcgg 2853
gcttattttt tctggcaacg gtagcctcgt cactttcccc gagtgctggc tggctgattg 2913
gcgcacggct gatccttgga ttagccgttg gcggcgtctc tgtgctggtt ccaagctttt 2973

35  tagcagagat tgccccaacg agtcatcgtg ggcggttagt cacacaaaat gagctgatgg 3033
tcgtgactgg ccagttactt gcttttgctc tcaatgcctt ttaggaacc acttttgta 3093
acgttcctgg tatctggcgc tggatgattg tattggcagt cattccggca attatcttag 3153

40  gtatcgggac ttattttgtt ccggaatctc ctcggttggt aatgatgaaa ggacggccgg 3213
cagcagcacg ttcaagtttg gaagtgttc gatctgctgc tgaagtgcca gcagagattg 3273
accatttgaa acagaatctt gccgaagatg ctaaacataa gcaggcgagt gttcgagcat 3333

45  tgaaaaccaa atggattgc cgactggctc tgattggcat cggcctaggc gtcattcagc 3393
aaattgctgg tatcaatgtc atgatgtatt atggcacctc aattttacaa atgacggggt 3453
ttgggcgaga tagcgccttg atcgccaaca ttgccaatgg ggttactgcc gttgctgcaa 3513

50  cgattgtgac gttgcaattg ttgaagcatg ttccgcggcg gccaatgctg attgtgggat 3573
tgattggctc aaccgtggcg attactgggt tcaccttcgc tagtcgacta ccagcggggt 3633
cgccattccg ggcatttgcg acaatcggga tgatgatgct gttcttggcg ttcttccaag 3693

55  gcgctatcag tccaatgact tggctgctga tgtctgaaat cttccctgaa caggttcggg 3753
gcatagggat gggcgtgca accttctgct tgtggttagc taactttggt gttggcgctc 3813

```

ES 2 334 050 T3

tgttccgat tggctgccc caaataggca tgttctggac attcgtttgc ttcacgsgga 3873  
 caaatttgat ttcattgctt ttcgttctga tttttgtgcc ggaacggct ggacgctccc 3933  
 5 tcgaaacttt gcaccgagag gagaaagccc gcttaaata ttaatgacaa gcgatttgtt 3993  
 caagaccaa aagttgcgct ttacaaaaag ttgatacca taaaggtgta tcaacaattc 4053  
 gatgaacctt cacaaagggg agccattggc tgagaacggg gaaaccgga cccttcgaac 4113  
 10 ctgttcgta atgcgagcgt agggatttgt gaatggt 4150

<210> 2

<211> 88

15 <212> PRT

<213> *Lactobacillus casei*

<400> 2

20

Met Glu Lys Arg Glu Phe Asn Ile Ile Ala Glu Thr Gly Ile His Ala  
 1 5 10 15  
 Arg Pro Ala Thr Leu Leu Val Gln Ala Ala Ser Lys Phe Asn Ser Asp  
 20 25 30  
 Ile Asn Leu Glu Tyr Lys Gly Lys Ser Val Asn Leu Lys Ser Ile Met  
 35 40 45  
 Gly Val Met Ser Leu Gly Val Gly Gln Gly Ala Asp Val Thr Ile Ser  
 50 55 60  
 Ala Glu Gly Ala Asp Glu Ala Asp Ala Ile Ala Ala Ile Thr Asp Thr  
 65 70 75 80  
 Met Lys Lys Glu Gly Leu Ala Glu  
 85

25

30

<210> 3

<211> 575

35 <212> PRT

<213> *Lactobacillus casei*

<400> 3

40

Met Ala Glu His Leu Lys Gly Ile Ala Ala Ser Asp Gly Ile Ala Thr  
 1 5 10 15  
 Ala Lys Ala Tyr Leu Leu Val Gln Pro Asp Leu Ser Phe Gln Lys Lys  
 20 25 30  
 Thr Val Asp Pro Ser Lys Glu Ile Asp Arg Leu Lys Gln Ser Leu  
 35 40 45  
 Asp Gln Ser Asn Asp Glu Leu Lys Val Ile Arg Ala Lys Ala Ala Glu  
 50 55 60  
 Ser Leu Gly Glu Glu Glu Ala Gln Val Phe Asp Ala His Met Met Ile  
 65 70 75 80  
 Leu Ala Asp Pro Asp Phe Thr Gly Gln Val Glu Thr Lys Ile Lys Asp  
 85 90 95  
 Glu Lys Val Asn Ala Glu Gln Ala Leu Lys Glu Val Ser Glu Phe Phe  
 100 105 110  
 Ile Lys Thr Phe Glu Gly Met Thr Asp Asn Pro Tyr Met Gln Glu Arg  
 115 120 125  
 Ala Ala Asp Val Arg Asp Val Thr Lys Arg Ile Met Ala His Leu Leu  
 130 135 140  
 Gly Arg Asn Leu Pro Asn Pro Ala Leu Ile Asp Glu Glu Val Val Val  
 145 150 155 160  
 Val Ala His Asp Leu Thr Pro Ser Asp Thr Ala Gln Leu Asn Lys Lys  
 165 170 175  
 Tyr Val Lys Ala Phe Val Thr Asp Ile Gly Gly Arg Thr Ala His Ser  
 180 185 190  
 Ala Ile Met Ala Arg Ser Leu Glu Ile Pro Ala Val Val Gly Thr Asp  
 195 200 205  
 Asp Ile Thr Lys Lys Ala Asn Asn Gly Asp Leu Ile Ser Val Asp Gly  
 210 215 220

65

ES 2 334 050 T3

5 Leu Thr Gly Glu Val Val Val Asp Pro Thr Asp Asp Glu Val Ala Lys  
 225 Phe Lys Gln Asp Ala 230 Glu Ala Phe Ala Lys 235 Gln Lys Ala Glu Trp Ala  
 245 Leu Leu Lys Thr Ala Lys Ser Ile Thr Ala Asp Gly Lys His Phe Asp  
 260 Val Ala Ala Asn Ile Gly Thr Pro Lys Asp Leu Asp Gly Val Leu Ala  
 275 Asn Gly Ala Glu Gly Ile Gly Leu Tyr Arg Thr Glu Phe Leu Tyr Met  
 290 Asp Ser Ala Glu Leu Pro Thr Glu Asp Asp Gln Phe Glu Ala Tyr Lys  
 305 Lys Val Val Glu Thr Met Ser Pro Lys Pro Val Val Val Arg Thr Met  
 325 Asp Ile Gly Gly Asp Lys His Leu Pro Tyr Leu Pro Leu Pro Glu Glu  
 340 Gln Asn Pro Phe Leu Gly Tyr Arg Ala Ile Arg Ile Ser Leu Asp Arg  
 355 Gln Asp Ile Phe Arg Thr Gln Leu Arg Ala Leu Leu Arg Ala Ser Ala  
 370 Phe Gly Asn Leu Arg Ile Met Phe Pro Met Ile Ala Thr Ile Ala Glu  
 385 Phe Lys Gln Ala Arg Gln Ile Phe Thr Glu Gln Lys Asp Lys Leu Val  
 405 Lys Asp Gly Val Lys Val Ser Asp Asp Ile Gln Leu Gly Ile Met Ile  
 420 Glu Ile Pro Ala Ala Ala Val Leu Ala Asp Gln Phe Ala Lys Tyr Val  
 435 Asp Phe Phe Ser Ile Gly Thr Asn Asp Leu Ile Gln Tyr Ser Met Ala  
 450 Ala Asp Arg Gly Asn Glu His Val Ser Tyr Leu Tyr Gln Pro Tyr Asn  
 465 Pro Ser Ile Leu Arg Leu Ile Lys His Val Ile Asp Ser Ala His Lys  
 485 Glu Gly Lys Trp Ala Gly Met Cys Gly Glu Ala Ala Gly Asp Pro Ile  
 500 Met Val Pro Leu Leu Leu Gly Met Gly Leu Asp Glu Tyr Ser Met Ser  
 515 Ala Thr Ser Val Leu Lys Val Arg Ser Leu Met Lys Lys Leu Ser Thr  
 530 Ala Asp Met Ala Lys Met Asp Glu Ile Ala Leu Asn Gln Asn Ile Thr  
 545 Asn Asp Glu Asn Ala Asp Leu Val Lys Lys Thr Thr Gly Gln Lys  
 565 570 575

40

45

50

55

60

65