

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 329 470**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2004 PCT/FR2004/000610**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.10.2004 WO04085607**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2004 E 04720033 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **03.10.2018 EP 1604025**

54 Título: **Bacterias lácticas texturizantes**

30 Prioridad:

17.03.2003 FR 0303242

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

16.04.2019

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)
Langebrogade 1
1411 Copenhagen K , DK**

72 Inventor/es:

**HORVATH, PHILIPPE;
MANOURY, ELISE;
HUPPERT, SONIA y
FREMAUX, CHRISTOPHE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

DESCRIPCIÓN

Bacterias lácticas texturizantes

- La presente invención se refiere a la cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada el 26 de febrero en la CNCM con el número I-2980, a su utilización, así como a la utilización de una cepa de bacteria láctica del género *Streptococcus* que comprende al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias de nucleótidos SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8 para fabricar un producto alimenticio o un ingrediente alimenticio para texturizar un producto alimenticio, así como a un procedimiento de construcción de estas cepas.
- La industria alimentaria utiliza numerosas bacterias, especialmente en forma de fermentos, en particular bacterias lácticas, para mejorar el sabor y la textura de los alimentos, pero también para alargar la vida útil de conservación de estos alimentos. En el marco de la industria láctea, las bacterias lácticas se utilizan ampliamente para provocar la acidificación de la leche (por fermentación) pero también para dar textura al producto en el que están incorporadas.
- Entre las bacterias lácticas utilizadas en la industria alimentaria, se pueden citar los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Bifidobacterium*.
- Las bacterias lácticas de la especie *Streptococcus thermophilus* se utilizan de manera extensiva solas o en combinación con otras bacterias para la fabricación de productos alimenticios, especialmente productos fermentados. Se introducen en particular en la formulación de fermentos utilizados para la fabricación de leches fermentadas, por ejemplo, yogures. Entre ellas algunas juegan un papel preponderante en la elaboración de la textura del producto fermentado. Esta particularidad está estrechamente relacionada con la producción de polisacáridos. Entre las cepas de *Streptococcus thermophilus* pueden distinguirse cepas texturizantes y cepas no texturizantes.
- Se entiende por cepa de *Streptococcus thermophilus* texturizante una cepa que produce leches fermentadas que tienen, en las condiciones descritas en el ejemplo, una viscosidad superior a aproximadamente 35 Pa.s, un área de tixotropía inferior a aproximadamente 2000 Pa/s y un umbral de flujo inferior a aproximadamente 14 Pa. Una cepa de *Streptococcus thermophilus* puede definirse como muy texturizante porque produce leches fermentadas que tienen, en las condiciones descritas en el ejemplo, una viscosidad superior a aproximadamente 50 Pa.s, un área de tixotropía inferior a aproximadamente 1000 Pa/s y un umbral de flujo inferior a aproximadamente 10 Pa.
- Para responder a las exigencias industriales, se ha hecho necesario proponer nuevas cepas de bacterias lácticas texturizantes, especialmente de *Streptococcus thermophilus*.
- Asimismo, la invención propone resolver el problema de proporcionar una cepa de bacteria láctica que tenga buenas propiedades de texturación para los productos alimenticios.
- Para ello la invención propone la cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada el 26 de febrero a la CNCM con el número I-2980, a su utilización, así como a la utilización de una cepa de bacteria láctica del género *Streptococcus* para fabricar un producto alimenticio o un ingrediente alimenticio para texturizar un producto alimenticio.
- La invención propone una nueva cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada el 26 de febrero del 2003 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos con el número I-2980.
- La invención se refiere también a las secuencias de nucleótidos SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, así como a un ácido nucleico que comprende al menos una de estas secuencias de nucleótidos.
- La invención se refiere también a plásmidos, vectores de clonación y/o de expresión que comprenden al menos una de las secuencias de nucleótidos SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, así como un ácido nucleico que comprende al menos una de estas secuencias de nucleótidos.
- La invención se amplía también a bacterias hospedadoras transformadas por un vector de clonación o de expresión o un plásmido de clonación o de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID N°1.
- La invención se refiere también al procedimiento de construcción de las cepas descritas anteriormente caracterizadas porque las cepas se obtienen por transformación usando un plásmido o un vector que comprende al menos una de las secuencias de nucleótidos SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, o un vector que comprende un ácido nucleico que comprende al menos una de estas secuencias de nucleótidos.
- La invención propone también composiciones bacterianas que comprenden al menos una cepa descrita anteriormente. Unas composiciones alimenticias o farmacéuticas que comprenden al menos una cepa de acuerdo con la invención o al menos una cepa obtenida de acuerdo con el procedimiento de la invención o la composición bacteriana de acuerdo con la invención se describen también.
- La presente invención posee numerosas ventajas en términos de proporcionar textura a los medios en los que se incorpora. Especialmente permite obtener geles, a partir por ejemplo de leches fermentadas, que son espesos, adherentes, consistentes, fibrosos y resistentes a la mezcla y que no son granulosos.
- Otras ventajas y características de la invención serán evidentes al leer la descripción y los ejemplos proporcionados a modo puramente ilustrativo y no limitante que se indican más adelante.

- Las bacterias lácticas son procariotas, gram positivas que pertenecen al grupo taxonómico Firmicutes. Son heterótrofas y quimiorganótrofas; generalmente anaerobias o aerotolerantes, su metabolismo puede ser homo- o heterofermentario: las bacterias lácticas producen esencialmente ácido láctico por fermentación de un sustrato glucídico. Desprovistas de catalasa, las bacterias lácticas constituyen un grupo heterogéneo de bacterias en forma
- 5 coco para los géneros *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*, o en forma de bastoncillo para los géneros *Lactobacillus* y *Carnobacterium*. La denominación de bacteria láctica a menudo se extiende a otras bacterias relacionadas, tales como *Bifidobacterium*.
- Entre las cepas de bacterias lácticas que son apropiadas para la presente invención se pueden citar los géneros
- 10 *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Bifidobacterium*.
- La cepa de bacteria preferida de acuerdo con la invención es *Streptococcus thermophilus*.
- Streptococcus thermophilus* es una especie presente en la leche de manera natural y ampliamente utilizada en la industria alimentaria, y especialmente láctea ya que permite acidificar y texturizar la leche. Es una bacteria termófila homofermentaria.
- 15 La invención se refiere en primer lugar a la cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada el 26 de febrero del 2003 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos con el número I-2980.
- La invención también se refiere a las secuencias de nucleótidos de las SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8.
- Las secuencias de nucleótidos SEC ID N° 2 a SEC ID N° 8 son parte de un operón de aproximadamente 14350 pares de bases implicado en la síntesis de polisacáridos (PS). Este operón está incluido en la secuencia SEC ID N° 1. Esto significa que de acuerdo con la invención las secuencias SEC ID N° 2 a SEC ID N° 8 están incluidas en la secuencia SEC ID N° 1.
- De acuerdo con la invención, la estructura del operón se ha determinado (ver figura 1). Entre los genes *deoD* (cadena arriba del operón de PS) y *orf 14.9* (cadena abajo), se han identificado 17 ORF (fase de lectura abierta en inglés, o marco abierto de lectura) denominados *eps13A*, *eps13B*, *eps13C*, *eps13D*, *eps13E*, *eps13F*, *eps13G*, *eps13H*, *eps13I*, *eps13J*, *eps13K*, *eps13L*, *eps13M*, *eps13N*, *eps13O*, *eps13P* e *IS1193*. Los 16 primeros ORF situados sobre la cadena "con sentido" codifican potencialmente polipéptidos implicados en la producción de polisacáridos exocelulares o capsulares; el 17° ORF situado sobre la cadena "antisentido" codifica potencialmente una transposasa funcional que pertenece a la familia IS1193 (secuencia de inserción).
- 25 Es posible denominar y posicionar cada ORF. A continuación, se indica la denominación de cada ORF, en segundo lugar, la supuesta función de dicha proteína y finalmente en tercer lugar la posición de la región que comprende este ORF (con respecto a la secuencia SEC ID N° 1 como se indica en la lista de secuencias):
- *eps13A*: Regulador transcripcional (342..1802)
 - *eps13B*: Polimerización (regulación de la longitud de cadenas) y/o exportación de polisacáridos (1803..2534)
 - 35 - *eps13C*: Polimerización (regulación de la longitud de cadenas) y/o exportación de polisacáridos (2543..3235)
 - *eps13D*: Polimerización (regulación de la longitud de cadenas) y/o exportación de polisacáridos (3245..3985)
 - *eps13E*: Undecaprenil-fosfato glicosiltransferasa (4042..5409)
 - *eps13F*: Undecaprenil-fosfato glicosiltransferasa (5611..6195)
 - *eps13G*: Undecaprenil-fosfato glicosiltransferasa (6251..6634)
 - 40 - *eps13H*: Beta-1,4-galactosiltransferasa (6643..7092)
 - *eps13I*: Beta-1,4-galactosiltransferasa (7092..7607)
 - *eps13J*: Rhamnosiltransferasa (7597..8493)
 - *eps13K*: Glicosiltransferasa (8763..9797)
 - *eps13L*: Polimerasa de unidad repetitiva (9827..10969)
 - 45 - *eps13M*: Polimerasa de unidad repetitiva (10984..11793)
 - *eps13N*: Glicosiltransferasa (11844..12578)
 - *eps13O*: Glicosiltransferasa (12633..13016)
 - *eps13P*: Transportador transmembrana (13049..14482)
 - *IS1193*: Transposasa (complemento (14614..15870)).
- 50 La invención también se refiere a un ácido nucleico que comprende al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias de nucleótidos SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8.
- Las secuencias de nucleótidos SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8 pueden insertarse en un vector por ingeniería genética, especialmente por técnicas de ADN recombinante ampliamente conocidas por los especialistas en la técnica.
- 55 La invención se refiere igualmente a un vector de clonación y/o de expresión que comprende al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias de nucleótidos SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8 o un ácido nucleico como se define a continuación.
- 60 El vector preferido de acuerdo con la invención es un plásmido. Puede tratarse de un plásmido replicativo o integrativo.
- A partir de estos vectores y/o plásmidos es posible transformar una bacteria para incluir en ella estos vectores y/o plásmidos. Esta transformación puede realizarse mediante la técnica de electroporación o por conjugación, y de una

manera convencional para el especialista en la técnica.

La invención también se refiere a bacterias hospedadoras transformadas por un plásmido de clonación o de expresión o un plásmido de clonación o de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 1.

5 Las bacterias transformadas son preferentemente bacterias lácticas. En particular una bacteria láctica que puede escogerse entre los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pe-diococcus* y *Bifidobacterium*.

La cepa de bacteria láctica preferida de acuerdo con la invención es *Streptococcus thermophilus*.

10 La invención también se refiere a un procedimiento de construcción de una cepa o de una bacteria hospedadora transformada de acuerdo con la invención caracterizada porque se obtiene por transformación usando un vector que comprende al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias de nucleótidos SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8 o un ácido nucleico que comprende al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias de nucleótidos SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8.

15 De acuerdo con el procedimiento de la invención, el vector preferido es un plásmido.

Ventajosamente de acuerdo con el procedimiento de la invención la transformación se produce después de una inserción en el genoma de la cepa o de la bacteria hospedadora transformada por al menos un evento de recombinación.

20 La invención también se refiere a una composición bacteriana que comprende al menos una cepa de acuerdo con la invención o que comprende al menos una bacteria transformada de acuerdo con la invención.

Por composición bacteriana se entiende una mezcla de diferentes cepas, especialmente un fermento o una levadura.

25 Las mezclas de cepas preferidas de acuerdo con la invención son mezclas de *Streptococcus thermophilus* con otras *Streptococcus thermophilus*, o mezclas de *Streptococcus thermophilus* con *Lactobacillus delbrueckii subesp. bulgaricus*, o mezclas de *Streptococcus thermophilus* con otros *Lactobacillus* y/o con *Bifidobacterium*, o mezclas de *Streptococcus thermophilus* con otros *Lactococcus*, o mezclas de *Streptococcus thermophilus* con otras cepas de bacterias lácticas y/o de levaduras.

30 La invención también se refiere a utilización de una cepa de bacteria láctica del género *Streptococcus* que comprende al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias de nucleótidos SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8 o de una cepa de acuerdo con la reivindicación 1 o de una cepa obtenida de acuerdo con el procedimiento de las reivindicaciones 16 a 18 donde la cepa se selecciona entre el género *Streptococcus* para elaborar un producto alimenticio o un ingrediente alimenticio para texturizar un producto alimenticio.

35 Como producto alimenticio o ingrediente alimenticio preferido de acuerdo con la invención puede citarse un producto lácteo, un producto cárnico, un producto cerealista, una bebida, una espuma o un polvo.

Unas composiciones alimenticias o farmacéuticas que comprenden al menos una cepa de acuerdo con la invención o al menos una cepa obtenida según el procedimiento de la invención o la composición bacteriana de acuerdo con la invención se describen también.

40 Un producto lácteo que comprende al menos una cepa de acuerdo con la invención o al menos una cepa obtenida de acuerdo con el procedimiento de la invención o la composición bacteriana de acuerdo con la invención se describe también.

En el caso de la elaboración de un producto lácteo, ésta se realizará de la manera habitual en este campo, y especialmente por fermentación de un producto lácteo incorporando una cepa de acuerdo con la invención.

45 Como producto lácteo de acuerdo con la invención, puede citarse una leche fermentada, un yogurt, una crema madura, un queso, queso fresco, una bebida láctea, un producto lácteo retenido, queso fundido, crema de repostería, requesón o leche infantil.

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

Como leche de origen animal puede citarse la leche de vaca, de oveja, de cabra o de búfala.

50 Como leche de origen vegetal puede citarse toda sustancia fermentable de origen vegetal que puede utilizarse de acuerdo con la invención que proviene especialmente del grano de soja, arroz o malta.

La figura 1 representa la estructura genética del operón de PS de la cepa de acuerdo con la invención comparado con el operón de PS de otras cepas de *Streptococcus thermophilus* ya conocidas.

La figura 2 representa el plano factorial 1-2 del análisis de componentes principales (ACP) obtenido a partir de datos sensoriales sobre leches fermentadas obtenidas con las diferentes cepas el estudio.

55 La figura 3 representa los promedios de las puntuaciones obtenidas sobre las descripciones de TEXTURA EN LA CUCHARA para cada una de las cepas del estudio. Interpretación de resultados del ensayo de Newman-Keuls: la diferencia entre las cepas relacionadas por una misma letra no es significativa.

La figura 4 representa los promedios de las puntuaciones obtenidas sobre las descripciones de TEXTURA EN LA

BOCA para cada una de las fuentes del estudio. Interpretación de resultados del ensayo de Newman-Keuls: la diferencia entre las cepas relacionadas por una misma letra no es significativa.

A continuación, se describen ejemplos concretos, pero no limitantes de la invención.

Ejemplos

5 1/ Secuenciación del operón de PS de *Streptococcus thermophilus* CNCM I-2980

El fragmento de ADN que lleva el operón de PS de la cepa *Streptococcus thermophilus* CNCM I-2980 se ha obtenido por amplificación mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa, en inglés) a partir del ADN genómico extraído de dicha cepa. La amplificación se realizó con el termociclador Mastercycler (Eppendorf) utilizando la ADN polimerasa LA-Taq (BioWhittaker/Cambrex) y los siguientes cebadores: 5'-GGGTGAACGTATCTCAGTAATGGGGACTGG-3' y 5'-CCTGAGTTATGGGACGATTACTTGGCTG-3'. Las condiciones experimentales de esta amplificación son las siguientes: 14 ciclos de desnaturalización alternantes a 98°C durante 30 segundos e hibridación-elongación a 68°C durante 15 min., seguido de 16 ciclos de desnaturalización alternantes a 98°C durante 30 segundos e hibridación-elongación a 68°C durante 15 minutos con un aumento de 15 s por ciclo, y después un ciclo adicional de elongación a 72°C durante 10 min. El producto PCR se ha secuenciado de acuerdo con un enfoque de clonación por fragmentos.

2/ Caracterización molecular de la cepa de acuerdo con la invención comparada con cepas de *Streptococcus thermophilus* ya conocidas

• Secuencia del operón de PS

La secuencia del operón de PS de la cepa *Streptococcus thermophilus* CNCM I-2980 se ha obtenido a partir de un fragmento de ADN de aproximadamente 17100 pares de bases sintetizado por PCR en presencia de una matriz de ADN genómica purificada de la cepa y utilizando dos cebadores específicos de genes conservados (*deoD* que codifica una purina-nucleótido fosforilasa, y *orf14.9* de función desconocida) que flanquean generalmente al operón de PS en los *Streptococcus thermophilus* descritos en la bibliografía. La secuencia comprendida entre los genes *deoD* y *orf14.9*, que se corresponde con la secuencia SEC ID N° 1, se proporciona en la lista de secuencias.

• Organización genética del operón de PS

La figura 1 esquematiza la estructura genética del operón de PS de la cepa CNCM I-2980 establecida por el análisis de su secuencia nucleotídica, así como la estructura del operón de PS de otras 7 cepas de *Streptococcus thermophilus*. Para las diferentes estructuras, identificadas por el nombre de la cepa y por el número de acceso GENBANK (entre paréntesis), las flechas representan la posición, el tamaño y la orientación de los genes desde el codón de inicio hasta el codón de fin. El significado de los colores y/o motivos en el interior de las flechas se indica en la leyenda de la figura 1.

• Comparación con la bibliografía

El análisis estructural del operón de PS de la cepa CNCM I-2980 demuestra que posee una organización global similar a la de los operones de PS ya conocidos (ver figura 1): un primer ORF potencialmente implicado en la regulación de la transcripción del operón de PS, seguido de 3 ORF que probablemente intervienen en la regulación de la polimerización de las unidades repetidas de PS y/o sus exportados, seguidos de 11 ORF que codifican glicosiltransferasas y una polimerasa que asegura el ensamblaje de la unidad repetitiva, seguidas estas mismas por 1 ORF potencialmente implicado en el transporte de las unidades repetitivas a través de la membrana plasmídica.

El entorno genético del operón de PS de la cepa CNCM I-2980 es también similar al de otros operones de PS conocidos, cadena arriba el ORF *deoD* codifica una purina-nucleótido fosforilasa, y cadena abajo en sentido opuesto los ORF *IS1193* y *orf14.9* codifican respectivamente una transposasa (que pertenece a la familia de secuencias de inserción *IS1193*, elementos genéticos móviles) y una proteína de función desconocida.

Por tanto, la comparación de secuencia realizada entre las proteínas potencialmente codificadas por los ORF del operón de la cepa CNCM I-2980 y las disponibles en las bases de datos públicas (GENBANK) demuestra que el contenido genético del operón de PS de la cepa CNCM I-2980 es nuevo en su parte distal.

- La parte proximal del operón de PS de *Streptococcus thermophilus*, y más generalmente la de los estreptococos hasta ahora conocidos, comprende 4 ORF denominados *epsA* (o *cpsA*, o *capA*, o *wzg*), *epsB* (o *cpsB*, o *capB*, o *wzh*), *epsC* (o *cpsC*, o *cpaC*, o *wzd*) y *epsD* (o *cpsD*, o *capD*, o *wze*) en los que los productos polipeptídicos deducidos, para cada uno de los 4 ORF, presentan importantes similitudes de secuencia entre las cepas. A este nivel, los productos polipeptídicos deducidos de los ORF *eps13A*, *eps13B*, *eps13C* y *eps13D* del operón de PS de la cepa CNCM I-2980 no difieren de los deducidos de otros operones de PS (porcentaje de aminoácidos idénticos superior o igual al 94%).
- Inmediatamente después de la ORF *epsD*, la ORF *epsE* (o *cpsE*, o *capE*, o *wchA*) está presente en la mayoría de los operones de PS conocidos en *Streptococcus thermophilus*. En este caso también, las similitudes de secuencia son importantes entre productos polipeptídicos homólogos procedentes de diferentes secuencias conocidas; el producto de traducción del ORF *eps13E* de la cepa CNCM I-2980 es muy similar a sus homólogos que provienen de otras cepas.
- La organización de los 4 ORF siguientes (*eps13F*, *eps13G*, *eps13H* y *eps13I*) del operón de PS de la cepa CNCM I-2980, ya descrito, es menos frecuente entre las diferentes estructuras conocidas de operones PS de *Streptococcus thermophilus*. Esta organización se ha encontrado, a veces de manera incompleta, en las cepas IP6757 (número de acceso a GENBANK AJ289861), "tipo VII" (número de acceso a GENBANK AF454498) y "tipo III" (número de acceso a GENBANK AY057915).
- En la parte distal del operón, los 7 ORF *eps13J*, *eps13K*, *eps13L*, *eps13M*, *eps13N*, *eps13O* y *eps13P* son

nuevos y específicos del operón de PS de la cepa CNCM I-2980. Aunque reducida, su similitud de secuencia a nivel proteico o en algunos casos la existencia de motivos proteicos específicos, permite asignar una supuesta función a los productos de estos ORF: actividad potencial de glicosiltransferasa o polimerasa para el producto de los ORF *eps13J* a *eps13O*, o actividad de transporte transmembrana de PS para el producto del ORF *eps13P*.

5 **3/ Ensayo de reología comparado de la cepa *Streptococcus thermophilus* CNCM I-2980**

10 Las cepas de *Streptococcus thermophilus* utilizadas CNCM I-2423, CNCM I-2429, CNCM I-2432, CNCM I-2978 y CNCM I-2979 son cepas de colección de Rhodia Food. La mayoría de ellas se utilizan para la elaboración industrial de leches fermentadas o yogures y destacan por sus propiedades texturizantes. Son representativas de cepas descritas en la bibliografía. Se han estudiado a continuación en comparación con la cepa CNCM I-2980 y se han considerado como representativas de cepas texturizantes utilizadas actualmente en la industria agro-alimenticia.

Las cepas de *Streptococcus thermophilus* RD736 y RD676 son cepas industriales de Rhodia Food reconocidas por su débil poder texturizante. No se conocen los polisacáridos que pueden producir ni su operón de PS. Se han estudiado a continuación en comparación con la cepa CNCM I-2980 y se han considerado como representativas de cepas no texturizantes.

15 La leche fermentada utilizada se obtiene añadiendo 100 ml de leche UHT semi-descremada (Le Petit Vendéen®) por 3% (peso/volumen) de polvo de leche descremada. La esterilidad de la solución se obtiene mediante pasteurización a 90°C durante 10 minutos, la temperatura se mide en el interior de la leche. El soporte de fermentación obtenido de esta manera se inocula con la cepa a ensayar a razón de 10E+6 ufc/ml (unidad formadora de colonias/ml) después se incuba a 43°C (al baño maría) hasta obtener un pH de 4,6. El seguimiento del pH se registra de manera continua. 20 Las leches fermentadas obtenidas de esta manera se colocan en una estufa ventilada a 6°C, hasta su análisis.

Se efectuaron dos tipos de mediciones reológicas: viscosidad y flujo. Las mediciones de viscosidad se realizaron a 8°C sobre leches fermentadas, después de 1, 7, 14 y 28 días de almacenaje a 6°C. El instrumental utilizado es un viscosímetro Brookfield® de tipo RVF (Brookfield Engineering Laboratories, Inc.) montado sobre un pie Helipath (Brookfield Engineering Laboratories, Inc.). El viscosímetro está equipado con una aguja de tipo C y la velocidad de oscilación aplicada a la aguja es 10 vueltas/minuto. Las mediciones de flujo se efectuaron a 8°C sobre leches fermentadas, después de 14 días de almacenaje a 6°C y que previamente se habían mezclado. El instrumental utilizado es un reómetro AR1000-N (TA Instrument) equipado con cilindros co-axiales (Radio 1 = 15 mm, Radio 2 = 13,83 mm, Altura = 32 mm, Entrehierro = 2 mm). Para el segmento ascendente, la tensión de barrido continuo aplicada varía de 0 a 60 Pa durante un tiempo de 1 minuto de acuerdo con un modo lineal. Para el segmento descendente, la tensión de barrido continuo aplicada varía de 60 a 0 Pa durante un tiempo de 1 minuto de acuerdo con un modo lineal. Los valores tomados en cuenta son el área de isotropía y el umbral de flujo; este último se calcula de acuerdo con el modelo de Casson.

La viscosidad de la leche fermentada obtenida con la cepa *Streptococcus thermophilus* CNCM I-2980 se midió después de 1, 7, 14 y 28 días de almacenaje a 6°C (tabla 1). El valor de viscosidad medido después de un día de almacenaje es de 53,3 Pa.s. Este valor varía poco en el tiempo mostrando la estabilidad de la leche fermentada obtenida con la cepa *Streptococcus thermophilus* CNCM I-2980. Comparativamente (tabla 1), las viscosidades medidas para las leches fermentadas elaboradas con las cepas RD736 y RD676, consideradas como de débil poder texturizante, están comprendidas entre el 26 y 30 Pa.s. Las otras cepas ensayadas generan leches fermentadas que presentan viscosidades más débiles que las obtenidas con la cepa CNCM I-2980. Se puede distinguir un grupo de cepas que generan viscosidades del orden de 40 Pa.s (CNCM I-2979, CNCM I-2423 y CNCM I-2432) y un segundo, al que pertenecen CNCM I-2980, que generan viscosidades del orden de 50 Pa.s.

Tabla 1: Viscosidad y pH de las leches fermentadas obtenidas con las diferentes cepas ensayadas, después de diferentes tiempos de almacenaje a 6°C

Cepas	Viscosidad en Pa.s/pH			
	Almacenaje 1 día	Almacenaje 7 días	Almacenaje 14 días	Almacenaje 28 días
CNCM I-2980	53,3/4,50	53,0/4,44	53,0/4,42	53,5/4,40
CNCM I-2429	51,2/4,55	51,9/4,45	51,0/4,44	59,2/4,44
CNCM I-2978	50,4/4,56	51,8/4,52	49,6/4,49	51,0/4,45
CNCM I-2432	42,4/4,60	42,2/4,56	43,0/4,55	43,0/4,45
CNCM I-2423	42,0/4,60	41,9/4,40	42,0/4,37	43,0/4,30
CNCM I-2979	37,8/4,54	40,7/4,45	42,2/4,42	42,2/4,33
RD676	29,6/4,60	30,0/4,57	30,0/4,57	30,0/4,52
RD736	26,0/4,45	26,0/4,34	28,0/4,34	27,0/4,26

Las mediciones de flujo han permitido definir dos descriptores reológicos significativos (umbral de flujo y área de tixotropía) para la descripción reológica de las leches fermentadas (tabla 2). Para la leche fermentada obtenida con la cepa CNCM I-2980, los valores promedio son de 5,89 Pa y de 488 Pa/s para, respectivamente, el umbral de flujo y el área de tixotropía. Estos valores son significativamente diferentes de los obtenidos para las leches fermentadas obtenidas con las cepas consideradas como no texturizantes (RD676 y RD736). Por ejemplo, para la leche fermentada obtenida con la cepa RD676, estos valores promedio son respectivamente de 17,01 Pa y de 17083 Pa/s. En el caso de cepas consideradas como texturizantes, los valores de umbral de flujo y área de tixotropía están mucho más próximos a los obtenidos con la cepa CNCM I-2980, pero significativamente superiores, mostrando una capacidad texturizante superior a la de la cepa CNCM I-2980.

Tabla 2: Valores del umbral de flujo y del área de tixotropía (promedio de tres repeticiones) medidos usando el equipo AR1000-N de leches fermentadas obtenidas con las diferentes cepas ensayadas después de 14 días de almacenaje a 6°C.

Cepas	Umbral de flujo (Pa)	Area de tixotropía (Pa/s)
CNCM I-2980	5,89	488
CNCM I-2429	13,32	1215 (2 valores)
CNCM I-2978	10,51	728
CNCM I-2432	12,27	1245
CNCM I-2423	8,86	1344
CNCM I-2979	13,56	1786
RD676	17,01	17083
RD736	15,91	33100

4/ Caracterización sensorial de la cepa *Streptococcus thermophilus* CNCM I-2980, comparación con las cepas de referencia

Las leches fermentadas se evaluaron mediante un análisis sensorial después de 14 días de almacenaje a 6°C. El análisis descriptivo cuantitativo de las leches fermentadas, conservadas a una temperatura óptima de degustación de 12°C, lo realizó un jurado de 9 expertos sobre una escala lineal no estructurada de 0 a 6 puntos. Este análisis de perfil sensorial se duplicó con algunos días de diferencia. Los jueces, previamente seleccionados y entrenados, efectuaron su evaluación sobre 4 descriptores de textura en la cuchara: quebradiza, resistencia a la mezcla, fibroso, granulosidad, y sobre 4 descriptores de textura en la boca: se funde, adherencia, espesor, consistencia. Las diferencias sensoriales se evaluaron mediante un análisis de varianza (denominado ANOVA) de dos factores, de modelo fijo, seguido de un ensayo de comparación de promedio de Newman-Keuls con un umbral alfa del 5% sobre cada uno de los descriptores. Se puso en práctica un Análisis de Componentes Principales (ACP) con los descriptores sensoriales como variables y las cepas como individuos para visualizar el espacio producido. Una Clasificación Ascendente Jerárquica (CAH) permitió distribuir los grupos de cepas sobre el ACP. Los programas informáticos utilizados para estos análisis estadísticos son Fizz® (Biosystèmes), Statgraphics® y Uniwin plus®.

Los datos de la leche fermentada obtenidos con la cepa *Streptococcus thermophilus* CNCM I-2980 se compararon con los de las leches fermentadas obtenidas con las otras fuentes de referencia. Los valores promedio obtenidos con las diferentes cepas para los descriptores de textura aceptados se indican en la tabla 3 y las diferencias significativas que se obtienen de ANOVA y del ensayo de comparación de promedios se muestran en la tabla 4 y en las figuras 3 y 4.

Tabla 3: Promedio de las puntuaciones atribuidas por el jurado de análisis sensorial para las leches fermentadas obtenidas con las diferentes cepas del estudio sobre los descriptores de textura.

<u>Cepas</u>	Descriptores en la cuchara				Descriptores en la boca			
	Quebra-dizo	Resistencia a la mezcla	Granuloso	Fibroso	Se funde	Adherencia	Espesor	Consistencia
CNCM I-2980	0,89	4,97	0,04	5,09	1,32	4,27	5,06	4,41
CNCM I-2429	4,12	3,49	1,53	1,24	3,36	1,46	3,54	2,94
CNCM I-2978	3,39	4,35	0,42	2,83	2,96	1,97	3,86	3,41
CNCM I-2432	3,28	3,14	1,60	1,32	3,11	1,43	3,01	2,91
CNCM I-2423	1,64	4,02	0,16	3,44	2,25	2,48	3,61	3,30
CNCM I-2979	3,98	2,79	2,36	0,74	3,71	0,72	2,39	2,22
RD676	4,98	1,46	5,14	0,17	4,98	0,04	0,91	1,03
RD736	4,35	1,45	3,43	0,04	5,18	0,31	0,77	0,67

Tabla 4: Comparación de promedios sobre cada descriptor de textura en la cuchara y de textura en la boca mediante el ensayo Newman-Keuls al 5%. Interpretación de los resultados: la diferencia entre las cepas relacionadas con una misma letra no es significativa.

Cepas	Descriptores en la cuchara				Descriptores en la boca			
	Quebradizo	Resistencia a la mezcla	Granuloso	Fibroso	Se funde	Adherencia	Espesor	Consistencia
CNCM I-2980	E	A	E	A	D	A	A	A
CNCM I-2429	B	C	D	D	B	C	B	BC
CNCM I-2978	C	B	E	C	B	BC	B	B
CNCM I-2432	C	CD	D	D	B	C	C	BC
CNCM I-2423	D	B	E	B	C	B	B	B
CNCM I-2979	B	D	C	E	B	D	D	C
RD676	A	E	A	F	A	D	E	D
RD736	B	E	B	F	A	D	E	D

Las figuras 3 y 4 muestran una representación mediante histograma de los resultados obtenidos en la tabla 4.

Para las cepas RD676 y RD736, consideradas no texturizantes, todos los descriptores se diferencian significativamente de otras cepas. Entre las cepas texturizantes, la cepa CNCM I-2980 se diferencia netamente y significativamente en todos los descriptores, excepto en la granulosis donde no se diferencia de las cepas CNCM I-2978 y CNCM I-2423.

El ACP permite situar las cepas en función de su distancia en relación a los descriptores sensoriales.

El plano 1-2 del ACP en la figura 2 representa el 97,3% del espacio producido. La componente 1 divide dos grupos de variables sensoriales. El primer grupo que consiste en las variables: resistencia a la mezcla, espesor en la boca, consistencia en la boca, fibroso en la cuchara y adherencia en la boca, explica la componente 1 a la derecha. El segundo grupo, que consiste en las variables: se funde en la boca, quebradizo en la cuchara y granulosis en la cuchara, explica la componente 1 a la izquierda. El primer grupo de variables es anti-correlativo con respecto al segundo grupo. Estas variables permiten analizar las situaciones de las cepas sobre el plano. Por otro lado, el análisis en CAH permite clasificar las cepas en diferentes grupos que se representan en forma de círculos indicados sobre el plano factorial 1-2.

El plano factorial divide varios grupos de cepas que aportan propiedades de textura diferentes. A partir de estos análisis se obtiene que las cepas RD736 y RD676 proporcionan a la leche fermentada una textura quebradiza y granulosa en la cuchara y que se funde en la boca. Del mismo modo, no proporcionan una textura espesa, adherente o consistente en la boca, ni son resistentes o fibrosas en la cuchara en comparación con otros grupos de cepas. Proporcionan por tanto una leche fermentada no texturizada. Por el contrario, las cepas CNCM I-2429, CNCM I-2432 y CNCM I-2979 proporcionan leches fermentadas medianamente texturizadas; las cepas CNCM I-2423 y CNCM I-2978 proporcionan leches fermentadas texturizadas, y la cepa CNCM I-2980 proporciona una leche fermentada muy texturizada. Este análisis demuestra que la cepa CNCM I-2980 aporta características de textura muy particulares en la leche fermentada en comparación con el resto de las cepas de referencia.

5/ Ensayo comparativo de resistencia a fagos de la cepa *Streptococcus thermophilus* CNCM I-2980

La sensibilidad de una cepa a un bacteriófago se establece por el método de placas de lisis. Se utilizaron cien µl de un cultivo de la cepa a ensayar y 100 µl de una dilución apropiada de un suero que contenía el bacteriófago a estudiar para sembrar 5 ml de medio agar sobreenfriado (agar al 0,6% peso/volumen) M17 suplementado con glucosa 10 mM en CaCl₂. La mezcla se vierte sobre la superficie de medio agar solidificado (agar al 1,5% peso/volumen) M17 suplementado con glucosa a 10mM en CaCl₂. Después de incubar a 42°C durante 16 horas, la sensibilidad de la cepa al bacteriófago se evalúa por la presencia de placas lisis. La ausencia de placas de lisis significa que esta cepa es resistente a los bacteriófagos ensayados. El espectro de sensibilidad de una cepa a los bacteriófagos (denominado también lisotipo) está constituido por el conjunto de sensibilidades y resistencias a los bacteriófagos estudiados.

La tabla 5 mostrada a continuación define los bacteriófagos utilizados para este estudio y su cepa de origen/propagación. Son cepas y fagos procedentes de la colección de Rhodia Food. Los bacteriófagos se seleccionaron por su poder infeccioso en las cepas texturizantes de referencia.

Tabla 5: Fagos

Nombre del fago	Cepa de origen
2972	CNCM I-2423
4082	RD729
4074	CNCM I-2429
4154	CNCM I-2429
1272	CNCM I-2978
4128	RD852
1255	CNCM I-2432
1765	RD728
4121	RD862

Para evaluar el interés industrial de la cepa CNCM I-2980 con respecto a los problemas asociados con los bacteriófagos, se evaluó y se comparó el lisotipo de la cepa CNCM I-2980 con el de las cepas texturizantes de referencia. La tabla 6 muestra las sensibilidades de las cepas a estos diferentes fagos (lisotipo) establecidas por el método de placas de lisis. Se observa que las seis cepas del estudio tienen lisotipos diferentes. En particular, la cepa CNCM I-2980 presenta un lisotipo distinto al de las otras cepas texturizantes ensayadas. En efecto los fagos ensayos no han podido infectar a la cepa CNCM I-2980.

Tabla 6: Lisotipo de cepas ensayadas

Fagos	Cepas					
	CNCM I-2980	CNCM I-2423	CNCM I-2978	CNCM I-2432	CNCM I-2429	CNCM I-2979
2972	-	+	-	-	-	-
4082	-	+	-	-	-	-
1272	-	-	+	-	-	-
4128	-	-	+	-	-	-
1255	-	-	-	+	-	-
1765	-	-	-	+	-	-
4074	-	-	-	-	+	-
4154	-	-	-	-	+	-
4121	-	-	-	-	-	+

+ : sensible al fago ensayado; -: resistente al fago ensayado

Lista de secuencias

<110> RHODIA CHIMIE

5 <120> Bacterias lácticas texturizantes

<130> P 02244 <160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 16032

10 <212> ADN

<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 1

ES 2 329 470 T5

tttgtaaaag	gacgccattt	ggcgcctt	ttgtgtgta	gctaatatct	gttcgaagt	60
ataetaagtt	aaaatttttc	aaactactag	aaaaataaa	aatatttga	agaagaagac	120
ttttaataaa	taggtaaata	tctgacaatt	taaagttaa	ctactaaaa	tgtgaaagt	180
agttcacaat	ataatggaaa	atgatataaa	ttaatgatt	gatatcata	tgaaaacggt	240
tttttgttt	tttttgaaaa	aatgacaat	tgaatgaaa	ttgtattaat	gttacaataa	300
taatgggaa	tacttaattt	taatttttag	gagcaattta	tatgagtctg	cgtacgaatc	360
gtaagcaaaa	acgtacgggt	aatagatcat	gggggatggg	caacgttga	ttgaccattc	420
tgtatgctat	tttagcattg	gtcttattat	tcaccatggt	caattataat	tccctatcct	480
ttaggttttt	gaacatcatt	atcactattg	gtttgttggg	agttcttgct	attagcatct	540
tccttcagaa	gactaagaaa	tcaccactag	tgacaacggt	tgtattgggt	atcttctcgc	600
tagttctct	ggttggatt	tttggtttta	aacaaatgat	tgacatcact	aaccgtatga	660
atcagacggc	agcattttct	gaagtagaaa	tgagcatcgt	ggttcctaag	gaaagtgaca	720
tcaaagatgt	gagccagctt	actagcgtac	aggcacctac	taaggtgat	aagaacaata	780
tcgagatcct	gatgtcagct	ctcaaaaaag	ataaaaaagt	tgatgttaa	gttgatgatg	840
ttgcctcata	tcaagaagct	tatgataatc	ttaagctcgg	caaatctaaa	gotatggct	900
tgagtgggtc	ttatgctagc	ctactagagt	ctgtcgtatg	taattatgct	tcaaatctaa	960
aaacaattta	tacttataaa	attaaaaaga	agaatagcaa	ctctgcaaac	caagtagatt	1020
caaaagtctt	caatatttat	attagtggta	ttgataccta	cggttcgatt	tcaacagtgt	1080
cacgttcaga	tgtcaatatt	attatgacag	taaacatgaa	tacacataag	attctcttga	1140
cgactactcc	acgtgatgca	tcggttaaga	ttcctgggtg	tggagcagac	cagtatgata	1200
aattaaccca	cgcaggtatt	tatggcgttg	aaacatctga	acaaactctg	gaagatctat	1260
atggtactaa	gattgattac	tatgcccga	tttaacttcc	atcttctcct	aagttgattg	1320
accaacttgg	tgtgtgaca	gtccataatg	atcaagcttt	cacaagtctt	catgggaagt	1380
ttgatttccc	agttggagat	atccaaatga	attcagagca	agcacttga	tttgttcgtg	1440
aacgctatag	tttagatggc	ggagataatg	atcgtggtaa	aaaccaggaa	aaagtcattt	1500
ctgcgatttg	aaacaagttg	gcttctctaa	agtctgtatc	aaactttact	tcaatcgtta	1560
ataatctcca	agactctggt	cagacaaata	tttctttgga	taccattaat	gctttggcta	1620
atacacaact	tgattcaggt	tctaaattta	cggtgacttc	tcaagcagta	actggtacag	1680
gttcaaccgg	acaattgacc	tcttatgcga	tgccaaattc	tagtctttac	atgatgaaac	1740
tagataattc	gagtgtggca	agtgcctctc	aagctatcaa	aaatctaag	gaggaaaaat	1800
aagtgttga	cgttcactca	catattgttt	ttgatgttga	tgatggctct	aaaactttag	1860
aagaaagttt	agatctcatt	ggtgaaagtt	acgccaggg	ggtacgtaag	attgtttcaa	1920
catcccatcg	tcgtaagggg	atgtttgaga	ctccagagga	taaaattttt	gccaactttt	1980
ctaaggtaaa	agcagaagca	gaagcacttt	atccagactt	aactatttat	tatggagggtg	2040
aactttatta	caacttagac	attgtggaga	aacttgaaaa	gaatctcatt	ccgcgcagtc	2100
acaacactca	atgtgcttg	attgagttta	gtgctcgcac	atcttgghaa	gaaattcata	2160
gtgggcttag	taatgttttg	agagcggggg	taacgcctat	tgttgcctcat	attgagcgct	2220
atgatgccct	cgaagaaaaa	gctgaccgtg	ttcgagaaat	catcaacatg	gggtgctata	2280
ctcaagttaa	tagctctcat	gttctaaaac	caaagctctt	tggagataaa	gataaagtaa	2340

ES 2 329 470 T5

gaaaaaacg	tgctcgttat	ttttggaga	aaaatttgg	tcatatggtt	gctagcgaca	2400
tgcataatct	tgggocgaga	ccaccattta	tgaagatgc	ttatgaaatt	gttaaaaaga	2460
actacggccc	caaacgtgct	aagaatcttt	ttattgaaa	tccccaaa	ttactagaaa	2520
atcaatattt	ataggagata	ttatgaatca	agataacact	aaaagtgatg	aaatcgacgt	2580
actagcattg	ctacataaac	tttggacgaa	gaagcttttg	attcttttca	cagcttttta	2640
tttcgctgct	ttcagtttct	taggtactta	ttcttttato	caaccaacat	atacatcaac	2700
aacgcgtatc	tatgttggtt	atcaggcaac	agataataat	aatctttctg	ctcaagattt	2760
gcaagctggt	acctatttgg	caaatgaacta	taagagttt	attacatcaa	atgatgtatt	2820
atcagaagtt	atnaagatg	aaaaattgaa	ttgagtgg	gcagaactgt	ctaaaatggt	2880
ttcagttaat	attcctactg	atactcgtct	tatttcaatt	tctgttaatg	ctaaaactgg	2940
tcaagatgcg	caaacacttg	ctaataaggt	tctggaagtt	gcttcaaaaa	aaatcaagaa	3000
ggtgacaaa	gttgaagatg	tcacaacgct	cgaagaagct	aaattgccag	agtcaccatc	3060
ttcaccacaa	atcaaacgta	atgtgcttct	tggggcagtg	cttgagggat	tccttgcatg	3120
ggttggtgta	ttggtacgtg	aaatcctaga	tgatcgtgtt	cgccgtccag	aagatgtgga	3180
agatgccctt	ggaatgacac	ttcttggat	tgtcctgat	acagataaga	tttaaggaga	3240
agaaatgcct	ttattaaagt	tagttaatc	aaaagttagc	tttgctaaaa	agacggaaga	3300
gtattataac	gctattcgca	caaatattca	atcttctggt	gctcagatta	aagtgtattg	3360
gattagctct	gttgaaactg	gtgaaggzaa	atcaacgaca	tctgttaact	tggcgatttc	3420
atctgctagt	gttgggtctc	gaacacttct	gattgatgcg	gatcgcgta	attctgtttt	3480
gtcgggtaca	tttaaatcaa	atgagcctta	taaaggctct	tcaaatctcc	tttcaggaaa	3540
tgccgatcta	aatgaaacga	tttgccaaac	tgatatttct	ggtttagatg	ttattgcatc	3600
tggtcctgta	ccacctaatc	caacaagctc	tttgcaaaat	gacaatttta	gacatttgat	3660
ggaagtgtct	gtagtctgtt	atgattatgt	tatcatttat	acaccacca	ttggtctggt	3720
cattgatgct	ggtattattg	cccacagcgc	tgatgctagt	cttttggtta	cagcagctgg	3780
aaaaattaaa	cgtcgtttcg	taactaagcc	ggtcgaacaa	ttgaacaaa	gtggttctca	3840
gttcttaggt	gtcgtcctta	ataaagttag	catgacagtt	gataaatatg	gatcatatgg	3900
ttcttacgga	tcatatggtg	aglacgggaa	aaaaacagac	caaaaagaag	gtcattcaag	3960
agcacatcgt	cgtagaaaaag	gatagcatta	atggggatga	tgcgctcct	tataccttaa	4020
cagattaaaa	aggggtttag	agtgaagaa	aaacaagaaa	ttcgtcgcac	tgaaattggt	4080
attatcacgt	tggttctggt	tgttttcgca	gccatggtag	ctagtaaaat	accatataca	4140
gagattacc	aaggagat	tgctctttta	ggtgtcgtac	atgtagtgtc	ttactatatac	4200
agtagttatt	atgaaaatct	taagtataga	ggctacttgg	atgaaactcat	tgcaactgtc	4260
aaatattggt	tcatatttgc	tctaattgca	acatttctct	cgttttttgc	agatggaagt	4320
ttttcaatct	cagctcggg	acttctttac	gtcaccatga	ttcaggtgt	tctcttatac	4380
gttacaana	ctgttcttaa	gtatttccgc	tcatctattt	atacacgtcg	taaaaagtaac	4440
aagaatattc	tcttgatttc	tgatcaggca	cgtcttgata	atgctttatc	tcgtatgaag	4500
gacaatattg	atggttaggt	ttcagcagtt	tggtcttgg	ataatcctta	tttactgtat	4560
ccatttatca	agagtgttaa	acctgaaaat	ttgattgaat	atgcgacaca	ctcagtagta	4620
gaccaagttt	tgatnaatct	gccaaagtgg	cagtacaaga	tttyggalta	tgctcacca	4680
tttgaactta	tgggaatccc	agtatccatt	aatttgaatg	cccttgaatt	tatgagtcag	4740
ggtgaaaaac	gtatccaaca	attgggtcct	ttcaaagttg	ttacgttttc	tacgcatttt	4800
tatagctatg	gagatatctt	ggcgaaaacgc	ttcctcgata	tctgtggagc	tctagttggt	4860
ttggtgctct	gtgggatgtt	tggaaatctc	ctttatccac	ttattcgtaa	ggatggtggg	4920
ccagccattt	ttgctcaaga	ccgtgtggga	gaaaatggac	gtatcttcaa	gttttataaa	4980
ttccgttcta	tgcgtgttga	tgctgaggaa	attaaaaagc	aattgatgga	taaaaatcaa	5040
atgtctggtg	gtatgtttaa	gatagacaat	gatccacgta	ttaccaaaat	tggacatttc	5100
attcgtaaaa	caagtcttga	tgaacttcca	caattttgga	atgittctaa	aggtgatatg	5160
agcttggtag	gaacacgtcc	accaacattg	gatgagtacg	aatcttatac	accggaacaa	5220
aaacgtcgtt	taagttttaa	acctgggtatc	acaggtcttt	ggcaagtaag	tggacgaagt	5280
gaaattactg	atcttgatga	agttgtaaaa	ctagatggtg	cttatatgga	tgggtggaca	5340
atctggcgag	atatcaaaat	cttattgaaa	acgattaaag	tagtagtaat	gaaggatgga	5400
gcaaaaatg	aacttcaaaag	atgattagat	gagaaaaata	atcttatattg	ttgcttctaa	5460
agggattcct	gcaaaaatag	gtggatttga	gacctttggt	gagaagttag	cagagttcca	5520
ataagacaaa	gatctccaat	attatgtagc	ttgtatgctg	gaaaactctg	caaaaatcagg	5580
aattagagca	gatactttat	caactgcact	gtgcgtagat	acaaatatct	attccttatg	5640
actgctgaac	aaccagaagaa	tacattagtc	attaccacca	ctgagagatt	gcgattaatg	5700
gagggctct	ttgagtcaga	tcaacttctc	atcaaatatt	tggcaggtat	agtagtcac	5760

ggagatggg	aagtggcgt	tccagaggg	gtcccaata	ttccttttg	tgatgcgatt	5820
gactttgcg	ctcatgaagt	tgtcgaccat	gtgtttatca	acttaccgag	tgaacattac	5880
gatctcaaac	atcttggttc	cgattttgaa	gtcatgggta	ttgatgtgag	tgtagatatt	5940
aacttatttg	atttcagggc	tttaaaaaat	aaaaaaatca	aacaagttg	agaccatagt	6000
atcgtgactt	ttactccaa	ttactacaaa	catagccata	tctttctaaa	gcgcatgttg	6060
gatatctttg	gggctgtgat	tggctctcta	atttgtggtc	tggctcgggat	tgtcttagct	6120
cctatcattc	ggaagatgg	aggaacctgc	tattttcgtt	cagaaacgag	tagggaaaaa	6180
cggtcgtatc	tttaattttt	ataaattccg	ttctatgtat	atagatgcg	aaaaacggaa	6240
aaaagaactt	atggctcaaa	accagatgca	gggtgggatg	tttaaatgg	ataatgacc	6300
acggattaca	ccaattggtc	agtttatccg	aaaaacaagt	ctggatgaat	tgccacagtt	6360
ttataatgta	ctagtgggtg	atagtgcctt	ggtaggtact	cgtccaccga	cagtggatga	6420
atttggaaa	ttacacccaa	gtcaaaaacg	acgacttaat	tttaaacgg	ggattaccgg	6480
cttatggcaa	gttagtgggc	gtagcaatat	tacggacttt	gacgaagttag	ttaaactcga	6540
tgttgaatac	atagataact	ggtcaalltg	gtcggatata	aagatattgt	tgaagactat	6600
cttcgtagta	tttaaaaaag	agggaaagta	gtagagtata	tcataaagt	ttgtttagta	6660
ggttcttctg	tggggcattt	ggcacacttg	aatatgctta	aaccttttg	gagtgaacag	6720
gaccgctttt	gggttacctt	tgataaagaa	gatgcaagaa	gtattttaaa	agatgagcag	6780
ttttatccgt	gctattttcc	tactaacaga	aattttaaaa	atttagtaaa	gaatactttt	6840
ttagcactta	aaatttttaag	aaaagaaaga	cctgacgtta	ttatttcatc	aggagcagcg	6900
gtagcagttc	cgttttttta	tcttggtaaa	ctgtttggag	cgaaaaacgg	ttatatagaa	6960
gtatttgata	gaatagataa	accgacagta	actgggaaat	tggtttatcc	agtgacagat	7020
aaatttattg	ttcagtgagg	ggagatgaaa	actgtctatc	ccaaagctat	taactctggg	7080
agtatttttt	aatgattttt	gttacagtgg	gaaccacga	acagcccttt	aataggctta	7140
ttaaaggaag	tgatcgttta	aaaaaagaag	gtattattac	agatgagggt	tttattcaga	7200
caggtttttc	aacttatgaa	cctcaatact	gtgactggaa	aaaacttacc	tcttattctg	7260
agatggacaa	ctacatgact	cactctgata	tcattataac	ccatggtggt	ccagcgacat	7320
tcattgggag	aattgccaaa	ggcaaaaaac	caattgttgt	tccaagacaa	gaaaaatatg	7380
gagaacatgt	aaatgatcat	cagttagagt	ttgcagaaca	ggtttctgga	cgttttggga	7440
gtattattgt	tgtagaagat	attacttcac	tctgtgaaat	tttattaaaa	ggaagtaacg	7500
ttatttgcca	aaagcagagt	caattttacc	ctaaaggatc	acagtttatt	tttaatttca	7560
aagagatagt	tgatgaactt	gtagaaggag	agattcgtga	aacctaaaa	acttgtactt	7620
atggcaacct	ataatggagg	aaaatactta	cgagagcaat	tagatagtgt	ttttttacaa	7680
aaaaatgtgg	atattactgt	cctgggtcgt	gacgatgggt	caattgacaa	tacgtgtgct	7740
attcttgatg	aatatagtaa	gagatacaac	ttaatatggt	attcagggca	acatctaaat	7800
ggtgcgaatg	gattttataa	tttgatggaa	gaagcagta	aaatggattt	tgactacttc	7860
gctttctgtg	atcaggatga	tgtttgggat	acagataaac	ttccatcgg	agtttctgca	7920
atttctgtgt	ttaatgaacc	tgctttat	tattgtggc	aaagattggc	cgacggtaat	7980
ttaaatttta	tagcaaatca	tgaactcaac	acagaacgga	cactccatac	aaggtttatc	8040
ctttctgatt	ttgctgggtg	tacaggagtt	ttcaataaat	cgttattaaa	ggaagtgtgt	8100
agctatagac	cgaagtatat	gttgatgcat	gatacatgga	tattaaaagt	ctgtttggct	8160
ctaggtggac	aggttattat	tgatacaaga	ccgcataatg	attataggca	acatggtggg	8220
aatacagttg	gtcttggaag	aagcttatct	gcatacttca	aacaggtaaa	acagtatata	8280
actgaaata	aagtggaaac	acagatgaag	gaacttctct	taggatattg	tgatagaatt	8340
atttcggagt	atgctgtaat	tgcaaatgct	tgttgtaatt	ataaaacgga	tcgtgaggca	8400
cgtacttttt	tattaaatag	aaataatggt	gatttttgca	cgatgggatt	aaatataacc	8460
tttaaatata	aagttctatt	aaataaatta	taatttatta	ggacgttggt	attggaataa	8520
ttttaatatt	acctatattc	ttattacaat	aggaaagtta	tttgcgattt	taataataaa	8580
ttttagggac	caatgaaata	tttaaaaagg	accttgctat	ttacaatatt	aaaagacagc	8640
aatccctaat	ttgttaaata	atttgctttt	tctttgggat	tattccaaag	aaataagatt	8700
atatttttgt	tgttaaaatt	gqatatatag	taattttaa	atataccttt	aaagtaagt	8760
aaatggagga	agagtttttg	cttttttagta	ttataatacc	tgtttttaat	gtcgaaaaa	8820
atcttgagga	gtgcttctc	togattatag	ggcagactga	tgaaatatct	gaaggatgtg	8880
aaataattct	tattaatgac	gggtcaacag	atgatagtgc	gaaaatttgt	gatgagtatg	8940
agcgaataa	tcttgaattg	ataaaggtat	ttcataggtc	aaatcatggt	ttgcttctta	9000
cacgaaggtt	tggatatcaa	catgccgtag	gaagatacat	aattaatgtt	gactcagatg	9060
attcgttggg	accgattgca	cttgaggtgc	tcaaaagcgc	aatcgtcga	tacaacaacc	9120
cagatgttat	tataattaac	cacaatacat	ataaaaatgg	tgraaaggag	attgcataca	9180

ataacatttt tacagagctt gtttctgccc agatagataa gctagatgtg ttgaaagagt 9240
ttctgactgg aaatcgtatt aatagcgttt gtgggtgcaat ttgtaaaaag gattgtattg 9300
atataaatag agactataat aatataaag gtcttaataa tggagaagat agccttcaaa 9360
agattgaaca attcaaaagt gcgaacacgt ttgcatatat aaataaacct ctctataatt 9420
atagggcagg atcgggtatg accacaaaat ttgatcgaaa ttattttaaa tcttttagaa 9480
tagttctgga tgaaattcaa aaagaacgag aaatgtggga tttcctgat gtagatagat 9540
atctttcaat taaagttttg tctattgctg gaagagcaat cacacagtca agatacaatt 9600
gttggggagaa taaaagcgag caaataagat acttgcataa tattcgtaat gatgactact 9660
ttaaaaaang cagtcttcaa ttggctacaa taaggaaata tcttcagaaa gaccatattt 9720
tactaataaa gatgttggat aagggttga ttcgtcttat agttttgatg ttggatatta 9780
aaaataagat aggtcagtt tgagagggaa agttttttaga ggataaatga atagtataga 9840
taagaagtat cgtattaaac ttgatacgtt aatatttttg atttttatta tgttagcaac 9900
tttcaactat tcgatggagt tatcaatagt tggaaatcca ttcaggcaag tgattcttgt 9960
actgatgctc atattattgt tgtttacaat catccttaag aaatacaca taaaaaaat 10020
gattgtattt attacggcta tagtgtatgg attagttaac tatcaggttt caggttatac 10080
agacttattt attttattgc ttgcggccta ttttgcggat caagtagatt ttaataacgt 10140
gctaaaagtt ctattttggg aaaaattagt gatattttta tgcgttaata tattttcagt 10200
gcttgggtqa atagagatga ctaaattctc catcaataag tatctatcca ttgtagaagc 10260
atatgctcca ggatattgtt cttcgaatgt atatggctgc caagcaggag ttttar.ttt 10320
actttattta tcaattaatc ggtataaatt gacaaagtta aaagttctat tagtttgggt 10380
tttgagtgtt ttagtataca ttattttaga atcaaggaca gagctaactc tagtatcagt 10440
aacaacagtt cttttattaa tatgtataa tccaaaaaac ttaataaag ttaagaggat 10500
actctcgtgg ggatattccat ctattttggg tttaaatttt gggttaatat atacttttc 10560
aatactcggg tacggtaatc ccattatgag cactgtaaat gatgtattat tcaatgggag 10620
aattgqcttg gctctcatga attttaatac ttatgggtat tcattatttg gctccccaat 10680
tgatgtttcg atagtagcta aaacgaatag atattatgct ttagataatg gttatacagt 10740
tctcgtttta tattacggcc taataggatt attatggtat tcatatattc aaattcagac 10800
tgcaaaaaaa ttagagaaga taaatgagtt ggtcctgatg gttgtactct ttatcatcaa 10860
tatctggggg atttatgaag gaaacatggt tcttttaggt ggaaatttca tgattatagc 10920
ttttcttctc aaagtaacag ataattattc agaagaatta aaaagttagt agggagctag 10980
tatatgatac caaaggttat tcactattgt tggtttggag gaaaacctct accagaagat 11040
gcaaaaatgt atactcagtc atggaaaaaa tatttaccga atlatgagat aaaagagtg 11100
aatgaaacaa actttgattt gaattqttqc gattatqttt aaagggcata tcaagaaaag 11160
aaatgggctt ttgtttcgga ttatgcaaga ctatggatta ttataatta cgggtggaatt 11220
tattttgata ctgatctcga gctaataagt tctcctgaac caatcataga aaatggagct 11280
tttttaggat gtgaactcaa tttcgaaaag gaattatcag gtgatactaa ccaaaactgaa 11340
cttgtaacc caggcttagg ttttgggtgc gaaccgaaga aggattttta tctgtagcta 11400
ttaaatttat acgaatcaca acactttatt gataaaaaatg gagacctcaa tttggaaaca 11460
atagtagtga aaacaactag actgttgaag gggcatggtt ttacaggtaa tgattctatt 11520
gaacgagttg caggaattaa tatttactct catgaatatt tttgcccaat taactatcgt 11580
acaggtagaa tttcagtcac tgaaaaaact gtatctatac accattacca agaaagttg 11640
ctttcggctt tagataagat tattaataag atagaacaga gtagaagtgg agttggaact 11700
cttgaataca aagtcagaag aattgrrtct aagccattta gaggagttaa tctcttgaag 11760
aagaagggaa ttttgggatt tctaaaaaaa tgataaagact gtggtattct taataggtct 11820
cataagtrct tccaatgat ggttgggtg cttttcatta tagtcttat tggacgtttt 11880
gtctgcattc aaaaagctct ataactctca cagtagtttt acccactata gaaattatag 11940
agccgaaaaa aatactgtcc aaggctaagg tgcctatcaa atcaaaaatg tccatagaag 12000
aagcgtattc gcatttaaat gcttgtatgc cggagcccaa tgggacttgt tatactatga 12060
acaaaataga aaatgcatat gatttgcaaa ttatcattgc ggcctataat accgaacaat 12120
atataaaaaga ttgcttgaat tctgtctgtg gtcaacattc aaaatataaa actttggtga 12180
cagttataaa tgatggttca acagatggaa cagagcatat acttgcctgg ataacttcgg 12240
aaaatagggg tggaaagcgag ctatgcatca gagttataaa tcaggacaac cgagggcttt 12300
cgggtgccag aaatgctgct ctttctaata ttgaagcaa gtatgtaatg ttttagact 12360
cagatgacat tctccagag aatactattt ctgittatgt agataaagca tttataactg 12420
atgcagatat tttacaagaa agttggattt cgttttagta tgaaaatgtg agtgaaaaca 12480
ttctggagga aaaagttttt gaagttggaa caaaaggata tgtttcggga tatccttggg 12540
gtaaactata caaaagttct gtactaaaaa atttttaatt tccaaaagga tactggtttg 12600

```

aagatacacc aatcactttt attccttgcag caatgccaat taaagtggta accataaagg 12660
atattgttta tggctatoga ctgaatccaa atggaattac agcaaagtca atctttcata 12720
agaaaacagt tgatactttt tgggttacgg aattatgttt gaacgaacta ccaagattca 12780
aagtgtcata tgatcagcaa tcatatgaat atttattaag acaatcattg atgaatgaag 12840
ccaggataaa gaatcaggga aagaaaatac gagaagcagt atttgcctg acatcagaal 12900
taatgaaaat ttatttttagt ggtttttctt caaaagattc aaagatgaag aaaatagaaa 12960
tagcacttag aaatagacaa tttatccagt ttgaattatc aaaactgtat ttgtaatgat 13020
agattaagtg agacagggag aacagttagt gaatagatac agatatttgt taaaaaacat 13080
agggcctttg accctaagta gtttttcaac caaattactt agtttctttt tggtagcgtt 13140
atataccaat atattatcga ctactgaata tggaacctat gatttattta atactacaat 13200
aggtgtatta ctcccgatcc tcacattgaa tatacaggaa gcggtgatga gatttccat 13260
tgacagtaag tatgatagaa aatcaatcgt gacagtgaca gcaaggttct ttattctttc 13320
aaatttaatt gttattcttg ggctttgggt aaattatata tttgtattta gcgtgattgc 13380
caagcagtat gccatatttt tcttctgat gtttttatcg cagtcgctat ccgggatgat 13440
aaccatgtat gtcagaggaa tagacaaaat atctgacttg tcttttcaa gtgtaatagc 13500
atctgttatt actatattgt taaatgtttc gttcttagca ttcttctact ggggacttgt 13560
tggatatttt atggccaata taatcgcccc gctgggtcaa tcaactttat tgattgttaa 13620
agcacatatt ttaggggata ttcatttaga gcaagcatat cagtctgaaa aaaatgaaat 13680
ggttaattat agtaaaccaat tgattgcaaa cagcatcggg tgggtgggtaa ataatttttc 13740
tgacagatat atcgttgtga ttttttggg gttggctgaa aatggaatat attcagtggc 13800
atcgaaaatt ccttcgatac ttaatatatt tcagacaatt ttaatacagg cgtggacgct 13860
gtctgctgta aaggatttcg accctgaggg taaaaacggc tttttcacca atacatataa 13920
agcatataat tgcgatgagg ttgttctatg ctctggaatt attgtattta acaaactggt 13980
agccagtttt ttgtatgcaa aagactttta tgttgccttg aaatacgtac catggttaac 14040
aattgcaatc gtattcggag caatgtccgg atatatggg ggaatttttg ctgctgtcaa 14100
ggattctaaa atatttgcga aatcaactgt ttgtggagcg ataactaatg taatattaaa 14160
ttaataactt acaccatta tgggaccatt gggagctgcl atgtctacgg cagtatccta 14220
ttttgggta tggattttta gatatttga gatatttga tccagggaga tatattagga ttagggttaa 14280
tatatttagg gatcttatta ctatttctt getgttttgt cagtcgatta tacttttgat 14340
tgaatggaa aattcttatt tatatgttct tgaatcggg atttttattt tgatagtttt 14400
gctatatttt aaggatattc ttttgctatt gaacaaagg agtaattcaa tcaaaatgaa 14460
gaaaagggga agtgaattat agtatgaaga tagggataat aacgtggttt acaggctcta 14520
attatggcac taaccttcag gcaatcgtc tccaatatta cttgagaagt cgtggttatg 14580
ggctctttgt caactgtagt gggtgacgaa aagctaact ctagagagga ccggataggt 14640
ccttttttta tgatgttca gtgtgatgaa gcaacgcttc ttaaagttga taaagttct 14700
aaaaccgaag cccaagcgtt tgatgtcttt gatcaactta ttagtctgtt caagttctgc 14760
gtttgaatag tccgtttcta gtgcgttttt gatgtattgc ttgtgtctaa gaaaagtcct 14820
aaagacagtt tgaataat gattgacctt gctcctattt tctctatca gttcaaagaa 14880
ctcatctact ctcttctcct gaaagtgaaa aaacaaaagc tgataaagtg tatagtagtc 14940
agtaagctct tttgaaaaga ctagtgtctt cgcaacaact tcatgtggtg ctaaagtttg 15000
gcggaaaagtc tttgaataaa aagaattgag agatagttta cagctgtcct tttggaagag 15060
tcgccagtga tttttcaagg ctctgatagg tagtgacttc ttatcgaact ggttcatgat 15120
tgcaattctt gtctttaaaa aggcaagtcc aagggtgctg atgatgtgga aacgatcaag 15180
aacgattttg acgtttggaa agaglclycg ggcagtggg atataggctc cagacatatac 15240
cattgtgata aactgtacct gttgtcggac tttcaatgga tacttcaaaa agtagtttcg 15300
tatagtagtt tggcggcgtat tatcaaggat ggttatgagt tegtttgtct cataattctg 15360
cgccacaaa gccaattcct ctttctgaa cccaaactca tccagagca taacagcagg 15420
gagtttgtca taatgttctt tgaagataaa ctgatcaagc ttacgataga cagtggacgt 15480
cgacacgca agtcttcttg caatatcagt tagtgacact ttctcagttt ggagttgtgt 15540
aacttttgt cggactagat tggagatttg gcagttttc tcaacgatag atgtctcagc 15600
cacccttact ctctacaaac ttttacctg gaaacgacgt tttttcagac gtagtagagt 15660
tggcgttccc gcttgcctga gaagagagat tttagagttt tttgaaagt catacttgat 15720
catctttcca tggcaatgag gacatgatgg tgaagggtaa tcaagttttg cttgaatctc 15780
gatatgagtg tcagtttcaa aaacaagtga aatcttgata tttgtctt tgattccgat 15840
taattctgtg ttattcttaa taagttctat aagctctcc taatgatggt ttggttctt 15900
ttcattatag ttcttatggg actttttgtg tacactcaaa aagctctata atccctacag 15960
tagttttanc cactacagaa attatagagc caatatatct cctgtctatt tttatgctac 16020

```

ttttgggta gc

- <210> 2
- <211> 906
- <212> ADN
- <213> *Streptococcus thermophilus*

ES 2 329 470 T5

<400> 2

```

aaggagagat tcgtgaaacc taaaatactt gtacttatgg caacctataa tggaggaaaa    60
tacttacgag agcaattaga tagtgltttt ttacaaaaaa atgtggatat tactgtcctg    120
gttcgtgacg atggttcaat tgacaatacg tgtgclatcc ttgatgaata tagtaagaga    180
tacaacttaa tafgtattc agggcaacat ctaaattgtt cgaatggatt trataatttg    240
atggaagaag cagtcaaaat ggattttgac tacttcgctt tctgtgatca ggatgatggt    300
tgggatcacg ataaactttc catcggagtt tctgcaattt gtagttttaa tgaacctgct    360
tratatattt gtggccaag attggccgac ggtaatttaa attttatagc aaatcatgaa    420
ctcaacacag aacggacact ccatacaagg tttatccttt ctgattttgc tggttgtaca    480
ggagttttca ataaatcgtt attaaaggaa gttgttagct atagaccgaa gtatatggtg    540
atgcatgata catggatatt aaaagtctgt ttggctotag gtggacaggt tattattgat    600
acaagaccgc atatgtatta taggcaacat ggtggtaata cagttggtct tggagaagt    660
ctatctgcat acttcaaca ggtaaaacag tatataactg aatataaagt ggaaccacag    720
atgaaggaac ttctcttagg atatggtgat agaattatct cggagtatgc tgaattgca    780
aatgcttgtt gtaattataa aacggatcgt gaggcacgta cttttttatt aatagaaat    840
aatgttgatt tttgcacgat gggattaat atcaccttta aattaaaagt tctattaat    900
aaatta                                           906

```

<210> 3

<211> 1032

5 <212> ADN

<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 3

```

atggaggaag agtttttctt ttttagtatt ataatacctg tttttaatgt cgaaaaatat    60
cttgaggagt gccttctctc gattataggg cagactgatg aaatatctga aggatgtgaa    120
ataattctta ttaatgacgg gtcaacagat gatagtgcga aaatttgtga tgagtatgag    180
cgaaaaatcc ctgaattgat aaaggatatt cataggtcaa atcatggttt gcttcttaca    240
cgaaggtttg gatatcaaca tgccgtagga agatacataa ttaattgtga ctcaqatgat    300
tcgttggaac cgattgcact tgaggtgctc aaagacgcaa tcgtcgaata caacaacca    360
gatgttatta tatttaacca caatacatat aaaaatggtg taaaggagat tgcatacaat    420
aacattttta cagagtctgt ttctgcccag atagataagc tagatgtggt gaaagagttt    480
ctgactggaa atcgatttaa tagcgtttgt ggtgcaattt gtaaaaagga ttgtattgat    540
ataaatagag actataataa atataaaggc cttaataatg gagaagatag ccttcaaaaag    600
attgaacaat tcaaaagtgc gaacacgttt gcatatataa ataaacctct ctataattat    660
agggcaggat cgggtatgac cacaaaatct gatcgaattt attttaaatc ttttagaata    720
gttctggatg aaattcaaaa agaacgagaa atgtgggatt ttctctgatg agatagatat    780
ttttcaatta aagttttgct tattgctgga agagcaatca cacagtcaag atacaattgt    840
tgggagaata aaagcagca aataagatac ttgcatgata ttctgtaatga tgactacttt    900
aaaaagcag tgcctcaatt ggctacaata aggaaatacc ttcagaaaga ccatatttta    960
ctaataaaga tgttggataa ggttttgatt cgtcttataq ttttgatggt ggatattaaa    1020
aataagatag gc                                           1032

```

<210> 4

10 <211> 1140

<212> ADN

<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 4

```

atgaatagta tagataagaa gtatcgtatt aaacttgata cgttaaatatt tttgattttt    60
attatggttag caactttcaa ctattcogatg gagttatcaa tagtttgaaa tccattcagg    120
caagtgattc ttgtactgat gctcatatta ttgttgttta caatcatcct taagaaatac    180
acaataaaaa aamtgattgt atttattacg gctatagtgt atggattagt taactatcga    240

```

```

gtttcaggtc atacagactt atttatttta ttgcttgccg cgtatgttgc ggatcaagta    300
gattttaata acgtgttaaa agttctattt tgggaaaaat tagtgatatt tttatcgcct    360
aatatatttt cagtgcctgg tgyaatagag atgactaaat tctccatcaa taagtatcta    420
tccattgtag aagcatatgc tccaggatat gtttcttcga atgtatatgg ctgccaaagca    480
ggagttttat ttttacttta tttatcaatt aatcggtrata aattgacaaa gttaaaagtt    540
ctattagttt ggtttttgag tgttttagta tacattattt gtagatcaag gacagagcta    600
atcttagtat cagtaacaac agttctttta ttaatatgta ataatccaaa aaactttaat    660
aaagttaaga ggatactctc gtggggatat ccatctattt tggttttaa ttttgggtta    720
atatataact ttcaataact cggttacygt aatcccatta tgagcactgt aaatgatgta    780
ttartcaatg ggagaattgc cttggctctc atgaatttta atacttatgg tatttcata    840
tttgccctccc caattgatgt ttcgatagta gctaaaacga atagatatta tgctttagat    900
aatggttata cagttctcgt tttatattac ggcctaatag gattattatg gtattcatat    960
attcaaattc agactgcaaa aaaattagag aagataaatg agttggtcct gatgggtgta    1020
ctctttatca tcaatatctg ggggatttat gaaggaaaca tggtttcttt aggtggaat    1080
ttcatgatta tagcttttct ttctaagta acagataatt attcagaaga attaaaaagt    1140

```

<210> 5

<211> 810

<212> ADN

5 <213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 5

```

tatatgatc caaaggttat tcaactattgt tggtttgag gaaaacctct accagaagat    60
gcaaaaatgt atatcगतc atggaaaaaa tatttaccga attatgagat aaaagagtgg    120
aatgaaacaa actttgattt gaattgttgc gattatgta aagaggcata tcaagaaaag    180
aaatgggctt ttgtttcggg ttatgcaaga ctatggatta ttataatta cgggtggaatt    240
tattttgata ctgatgtcga gctaataagt tctcctgaac caatcataga aaatggagct    300
tttttaggat gtgaactcaa tttcgaaaag gaattatcag gtgatactaa ccaaactgaa    360
cttggttaacc caggtctagg ttttgggtcg gaaccgaaga aggattttta tctgtgagcta    420
ttaaatttat acgaatcaca acactttatt gataaaaatg gagacctcaa tttgaaaca    480
atagtagtga aaacaactag actggtgag gggcatggtt ttacaggtaa tgattctatt    540
gaacgagtgt caggaattaa tatttactct catgaatatt ttgcccaat taactatcgt    600
acaggtagaa tttcagtcac tgaaaaaact gtatctatac accattacca agaaagtgg    660
ctttcggctt tagataagat tattaataag atagaacaga gtagaagtgg agttggaact    720
cttgaataca aagtcagaag aattgtttct aagccattta gaggagttaa tctctgagag    780
aagaagggaa ttttgggatt tctaaaaaaa

```

<210> 6

<211> 750

<212> ADN

10 <213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 6

```

gttcttcccta atgatggttt ggttgccttt cattatagtt cttattggac gttttgctg    60
cattcaaaaa gctctataat ctctacagta gttttaccba ctatagaaat tatagagccg    120
aaaaaaatac tgtccaaggc taagytgccl atcaaalcaa aaatgtccat agaagaagcg    180
tattcgcatt taaatgcttg tagtccgaga cccaatggga cttgttatac tatgaacaaa    240
atagaaaatg catatgattt gcaaattatc attgocgcct ataataccga acaatatata    300
aaagattgct tgaattctgt ctgtggtcaa cattcaaaa ataaaacttt ggtgacagt    360
ataaatgatg gttcaacaga tggaaacagag catatacttg ctggtataac ttcggaaaat    420
aggggtggaa gcgagctatg catcagagt ataaatcagg acaaccgagg gctttcgggt    480
gccagaaaat ctgctctttc taatattgaa gcaaagtatg taatgttttt agactcagat    540
gacattctcc cagagaatac tatttctgtt atgttagata aagcatttat aactgatgca    600
gatattttac aagaaaagtt gtattcgttt gatgatgaaa atgtgagtga aaacattctg    660
gaggaaaaag tttttgaagt tggaaacaaa ggatatgttt cgggatatcc ttggggtaaa    720
ctatacaaaa gttctgtatt aaaaaatttt

```

<210> 7

ES 2 329 470 T5

<211> 435
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 7

```

tttccaaaag gatactgggt tgaagataca ccaatcactt ttattcttgc agcaatgcc 60
attaaagtgg taaccataaa ggatattggt tatggctatc gactgaatcc aatggaatt 120
acagcaaagt caatctttca taagaaatca gttgatactt tttgggttac ggaattatgt 180
ttgaacgaac taccaagatt caaagtgtca tatgatcagc aatcatatga atatttatta 240
agacaatcat tgatgaatga agccaggata aagaatcagg gaaagaaaat acgagaagca 300
gtatttgctc tgacatcaga attaatgaaa atttatttta gtggtttttc ttcaaaagat 360
tcaaagatga agaaaataga aatagcactt agaaatagac aatttatcca gtttgaatta 420
tcaaaactgt atttg 435
    
```

5

<210> 8
 <211> 1452
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 8

10

```

gtgagacagg gagaacagtt agtgaataga tacagatatt tgttaaaaaa cataggcctt 60
ttgaccctaa gtagtctttc aaccaaatta cttagtttct ttttgggtacc gttatatacc 120
aatatattat cgactactga atatggaacc tatgatattt ttaatactac aataggtgta 180
ttactcccgga tcttcacatt gaatatacag gaagcgggtga tgagattttc cattgacagt 240
aagtatgata gaaaatcaat cgtgacagtg acagcaaggt tctttattct ttcaaattta 300
attgttattc ttgggctttg ggtaaattat acatttgrat tttagcgtgat tgccaagcag 360
tatgccatata ttttcttctc gatgttttta tcgcagtcgc tatccgggat gataaccatg 420
tatgtcagag gaatagacaa aatatctgac ttgtcttttt caagtgtaat agcatctgtt 480
attactatata gcttaaattg ttcgttctta gcatttcttc actggggact tgttggatat 540
tttatggcca atataatcgg cccgatgggt caatcacttt atttgattgt taaagcacat 600
atthtagggg atattcattt agagcaagca taccagtcg aaaaaaatga aatggttaat 660
tatagtaaac cattgattgc aaacagcatc gcgtggtggg taataattt ttclgacaga 720
tatatcgttg tgattttttg tgggttggct gaaaatggaa tatattcagt ggcacgaaa 780
attccttcga tacttaatat ttttcagaca atttttaatc aggcgtggac gctgtctgct 840
gtaaaggatt tcgaccctga ggataaaaac ggctttttca ccaatacata taaagcata 900
aattgcatga tggttgttct atgctctgga attattgtat ttaacaaact gttagccagt 960
tttttgtatg caaaagactt ttatgttgc tggaaatag taccatgggt aacaattgca 1020
atcgtattcg gagcaatgct cggatatatt ggaggaattt ttgctgctgt caaggattct 1080
aaaatatttg cgaaatcaac tgtttgtgga gcgataacta atgtaatat aaatttaata 1140
cttacaccca ttatgggacc attgggagct gctattgcta cggcagtatc ctattttgag 1200
gtatggattt ttagatattt gcaatccagg agatataata ggattagggg taatataatt 1260
agggatctta ttacttattt cttgctgttt tgtcagtcga ttatactttt gattgaaatg 1320
gaaaattctt atttatatgt tcttgaaatc ggaattttta ttttgatagt tttgctatat 1380
tttaaggata ttcttttgc attgaacaaa ggtagtaatt caatcaaat gaagaaaagg 1440
ggaagtgaat ta 1452
    
```

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada el 26 de febrero de 2003 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos con el número I-2980.
2. Secuencia de nucleótidos SEC ID N° 1.
- 5 3. Secuencia de nucleótidos SEC ID N° 2.
4. Secuencia de nucleótidos SEC ID N° 3.
5. Secuencia de nucleótidos SEC ID N° 4.
6. Secuencia de nucleótidos SEC ID N° 5.
7. Secuencia de nucleótidos SEC ID N° 6.
- 10 8. Secuencia de nucleótidos SEC ID N° 7.
9. Secuencia de nucleótidos SEC ID N° 8.
10. Ácido nucleico que comprende al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias de nucleótidos SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8.
- 15 11. Vector de clonación y/o de expresión que comprende al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias de nucleótidos SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8 o un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10.
12. Vector de acuerdo con la reivindicación 11 **caracterizado porque** es un plásmido.
13. Bacteria hospedadora transformada por un vector de clonación o de expresión o un plásmido de clonación o de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 1.
- 20 14. Bacteria de acuerdo con la reivindicación 13 **caracterizada porque** es una bacteria láctica.
15. Bacteria de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, **caracterizada porque** es una bacteria láctica seleccionada entre los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Bifidobacterium*.
- 25 16. Procedimiento de construcción de una cepa de acuerdo con la reivindicación 1 o de una bacteria de acuerdo con las reivindicaciones 13 a 15 **caracterizado porque** la cepa o la bacteria se obtienen por transformación usando un vector que comprende al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias de nucleótidos SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8 o un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10.
- 30 17. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16 **caracterizado porque** la transformación se realiza después de una inserción en el genoma de la cepa o de la bacteria por al menos un evento recombinante.
18. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16 o 17 **caracterizado porque** el vector es un plásmido.
19. Composición bacteriana que comprende al menos una cepa de acuerdo con la reivindicación 1 o al menos una bacteria transformada de acuerdo con las reivindicaciones 13 a 15.
- 35 20. Uso de una cepa de bacteria láctica del género *Streptococcus* que comprende al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias de nucleótidos SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8 o de una cepa de acuerdo con la reivindicación 1 o de una cepa obtenida de acuerdo con el procedimiento de las reivindicaciones 16 a 18 en el que la cepa se selecciona entre el género *Streptococcus* para elaborar un producto alimenticio o un ingrediente alimenticio para texturizar un producto alimenticio.
- 40 21. Uso de acuerdo con la reivindicación 20 **caracterizado porque** el producto alimenticio o ingrediente alimenticio es un producto lácteo, un producto cárnico, un producto cereal, una bebida, una espuma o un polvo.
22. Uso de acuerdo con la reivindicación 21 en el que el producto lácteo es una leche fermentada, yogur, crema madurada, queso, queso fresco, bebida láctea, producto lácteo retenido, queso fundido, crema de repostería, requesón o leche infantil.
- 45 23. Uso de acuerdo con la reivindicación 21 en el que el producto lácteo comprende leche de origen animal y/o vegetal.
24. Uso de acuerdo con la reivindicación 20 o 24 **caracterizado porque** la cepa pertenece a la especie *Streptococcus thermophilus*.

Figura 2: Representación gráfica del plano factorial 1-2 del ACP obtenido a partir de datos sensoriales sobre las leches fermentadas obtenidas con las diferentes cepas del estudio.

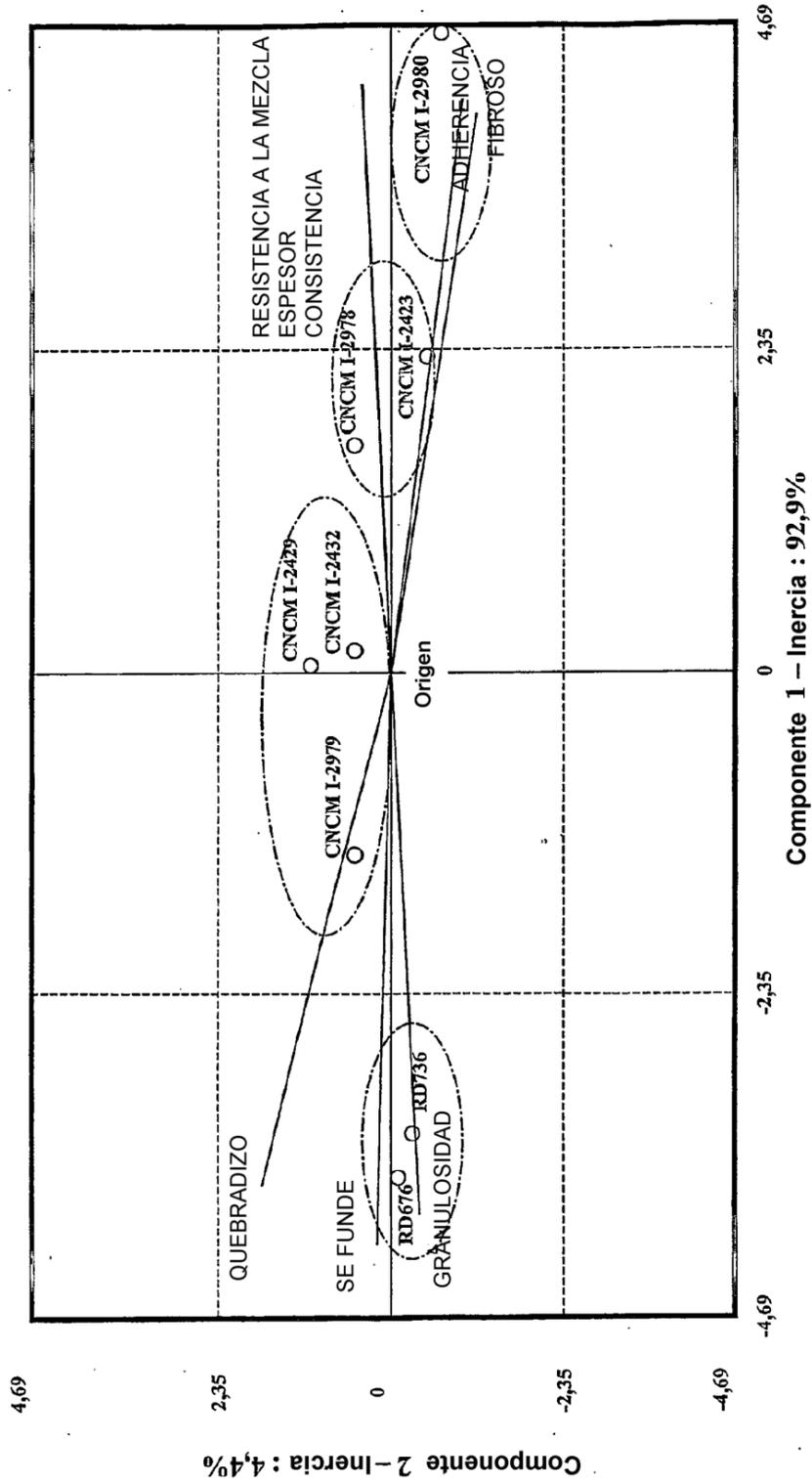


Figura 3: Representaciones gráficas de promedios de puntuaciones obtenidas sobre los descriptores de TEXTURA EN LA CUCHARA para cada una de las cepas del estudio. Interpretación de los resultados del ensayo de Newman-Keuls: la diferencia entre las cepas relacionadas con una misma letra no es significativa.

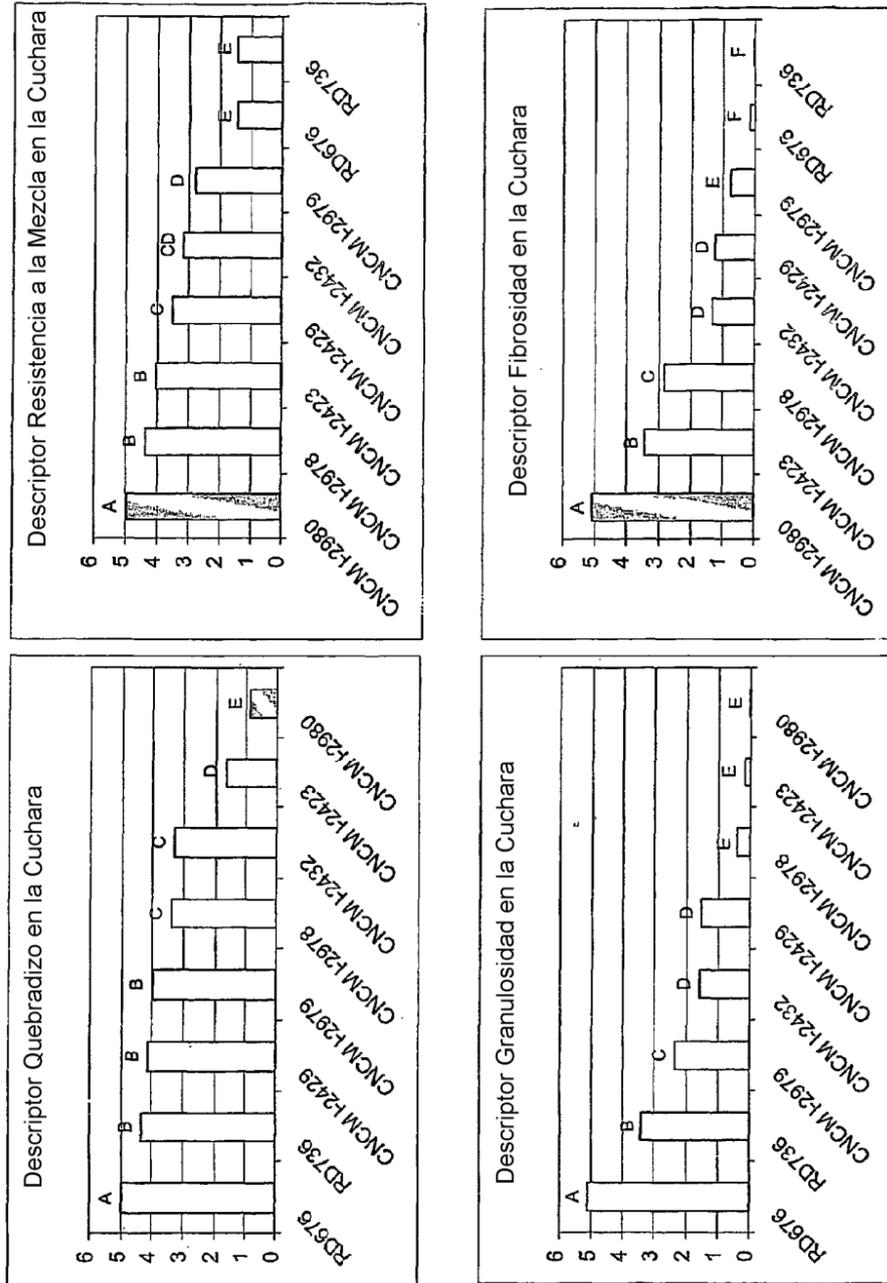


Figura 4: Representaciones gráficas de promedios de puntuaciones obtenidas sobre los descriptores de TEXTURA EN LA BOCA para cada una de las cepas del estudio. Interpretación de los resultados del ensayo de Newman-Keuls: la diferencia entre las cepas relacionadas con una misma letra no es significativa.

