

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 045**

51 Int. Cl.:

C12N 15/01 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 7/66 (2006.01)
A23L 1/03 (2006.01)
A23L 1/302 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
C12R 1/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2007 E 07820948 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 2079837**

54 Título: **Procedimiento de obtención de variantes de bacterias lácticas útiles para producir la vitamina K2 y aplicaciones para la preparación de productos alimenticios**

30 Prioridad:

04.10.2006 FR 0608690

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

24.09.2014

73 Titular/es:

**COMPAGNIE GERVAIS DANONE (100.0%)
17, BOULEVARD HAUSSMANN
75009 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

**GARAULT, PEGGY;
QUERE, GAËLLE;
BEAL, CHLOË;
BOMCHIL, NATALIA;
FAURIE, JEAN-MICHEL;
GOBERT, GUILLAUME y
LIPOWSKI, GÉRARD**

74 Agente/Representante:

JORDA PETERSEN, Santiago

ES 2 498 045 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

Procedimiento de obtención de variantes de bacterias lácticas útiles para producir la vitamina K2 y aplicaciones para la preparación de productos alimenticios.

5 La presente invención se refiere al campo de los productos alimenticios ricos en nutrientes, vitaminas y/u oligoelementos con el fin de mejorar el contenido y equilibrio cualitativo y cuantitativo de las aportaciones nutricionales en el ser humano.

10 La invención se refiere más particularmente a los medios para enriquecer los alimentos con vitamina K.

De manera más precisa, la presente invención se refiere a la obtención de variantes de cepas de bacterias lácticas que producen, en unas condiciones de fermentación estándar, por lo menos aproximadamente 1,2 veces más vitamina K2 que las cepas de bacterias lácticas de partida cultivadas en las mismas condiciones.

15 La invención también se refiere a un procedimiento para preparar productos alimenticios, en particular productos fermentados y/o productos lácteos frescos, enriquecidos con vitamina K2, así como a los productos alimenticios así obtenidos.

20 La vitamina K es una vitamina liposoluble que se presenta en dos formas naturales: la vitamina K1 (o filoquinona) y la vitamina K2 (o menaquinona).

La vitamina K1 es sintetizada por los vegetales. Se encuentra principalmente en las hortalizas verdes (hortalizas de hoja) y en el aceite de soja. La vitamina K1 interviene más directamente en el proceso de coagulación de la sangre.

25 En cuanto a la vitamina K2, es producida por las bacterias de la flora intestinal. También aparece en cantidades pequeñas en ciertos alimentos después de un proceso de fermentación (queso, productos asiáticos típicos tales como el miso y el natto japonés, a base de soja fermentada, etc.). Numerosas bacterias son capaces de sintetizar la vitamina K2. Así, además de las bacterias de la flora intestinal, y en particular las especies *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Bacteroides spp.*, se pueden citar ciertas especies o subespecies de bacterias lácticas tales como *Lactococcus lactis spp. lactis*, *Lactococcus lactis spp. cremoris*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Propionibacterium sp.* La cantidad de vitamina K2 sintetizada por estas bacterias generalmente varía de aproximadamente 29 a 90 µg/l de leche fermentada (Morishita *et al.*, 1999). Es importante subrayar que las mediciones de producción de vitamina K2 se realiza más frecuentemente a partir de liofilizados de residuos celulares y los resultados de estas mediciones revela una gran heterogeneidad de los niveles de producción en función de las cepas ensayadas, que puede variar de la unidad a más del triple (Morishita *et al.*, 1999; Parker *et al.*, 2003). En términos de actividad biológica, la vitamina K2 se conoce sobre todo por su acción sobre la calcificación de los tejidos blandos.

40 La vitamina K se ha descrito inicialmente por su papel esencial en el proceso de coagulación de la sangre. Así, grandes carencias de vitamina K conducen a hemorragias, con alargamiento anormal del tiempo de coagulación, y a equimosis. Durante largo tiempo, se ha considerado que las carencias grandes de vitamina K eran más bien raras en el adulto, pudiendo las necesidades estar cubiertas en principio de manera satisfactoria por una alimentación variada y equilibrada y gracias a la producción endógena de la vitamina por las bacterias cólicas. A este respecto, las personas en riesgo son típicamente:

- los recién nacidos, cuyos intestinos en el nacimiento no tienen las bacterias que producen vitamina K;
- las personas cuyas funciones hepáticas, biliares o intestinales están perturbadas (enfermedades hepáticas, mucoviscidosis, colitis, disenterías, etc.); e
- quien toman antibióticos durante mucho tiempo.

55 Más recientemente, se ha descubierto que el impacto de la vitamina K en la salud humana no se limitaba a su papel en los mecanismos de coagulación sanguínea. De hecho, desde los años 80, la vitamina K también se ha reconocido por su papel en el metabolismo óseo (Hart *et al.*, 1984; Hart *et al.*, 1985).

60 Esta vitamina desempeña la función de cofactor en una reacción enzimática que condiciona la actividad de osteocalcina en el marco de la regulación de la formación ósea (Hauschka PV *et al.*, 1989; Ducey P *et al.*, 1996). Su papel consiste de manera más precisa en condicionar la carboxilación de la osteocalcina, proteína clave que regula el proceso de formación ósea. En el caso de carencia de vitamina K, esta reacción no tiene lugar, provocando el aumento de la proporción sanguínea entre osteocalcina descarboxilada y osteocalcina carboxilada (Väänänen *et al.*, 1999).

65 La evolución demográfica de los países occidentales se ha traducido en un envejecimiento progresivo de la población, asociado corolariamente a un incremento de la prevalencia de las patologías degenerativas, en particular

de la osteoporosis. A este respecto, la osteoporosis se reconoce desde entonces como un problema principal de salud pública.

5 Las estimaciones demográficas realizadas en los años 90 han hecho sonar la alarma al prever un incremento considerable de la incidencia de esta patología en los siguientes 50 años, en particular en personas de la tercera edad. Por lo tanto, se ha impuesto rápidamente la necesidad y la urgencia de tomar acciones con el fin de prevenir esta patología, hasta entonces poco investigada y tratada de manera tardía.

10 Ahora se reconoce que la prevención de la osteoporosis debe comenzar desde la niñez, a través de un crecimiento óseo óptimo, y continuar toda la vida mediante un mantenimiento de la masa ósea. Se sabe que los factores nutricionales juegan un papel importante en el desarrollo y el mantenimiento del patrimonio óseo. Hasta ahora, las estrategias nutricionales contempladas o propuestas para prevenir la osteoporosis se basan esencialmente en dos factores clave que son el calcio y la vitamina D. Sin embargo, se sabe ahora que otros factores nutricionales podrían presentar un interés notable.

15 Debido a su papel principal en la formación ósea, la vitamina K aparece cada vez más en la bibliografía como una vía prometedora para preservar la salud ósea del ser humano a lo largo de la vida.

20 Las aportaciones nutricionales recomendadas de vitamina K en el ser humano (1,5 µg/día/kg de peso corporal) se han establecido considerando únicamente su papel en los fenómenos de coagulación. Ahora bien, unos estudios recientes sugieren que estas aportaciones recomendadas se subestiman finalmente si se considera también la actividad de la vitamina K en el metabolismo óseo (Ronden *et al.*, 1998).

25 Aunque las necesidades de vitamina K aún se conocen poco, esto no quiere decir que bajas aportaciones se asocien a una baja masa ósea y a un riesgo incrementado de fracturas en el adulto (Hart *et al.*, 1985; Knapen *et al.*, 1989; Szulc *et al.*, 1993; Booth *et al.*, 2000). Además, unos estudios de intervención en mujeres menopáusicas han demostrado que la vitamina K podía permitir disminuir las pérdidas óseas para este grupo objetivo (Shiraki *et al.*, 2000; Braam *et al.*, 2003). Por último, unos estudios en el animal sugieren que podría jugar un papel favorable durante el pico de masa ósea, tanto mejor en el caso de asociación sinérgica con la vitamina D. Sin embargo, los estudios que relacionan claramente la vitamina K y el crecimiento óseo solamente se han realizado hasta ahora en el animal.

30 Además, unos estudios recientes han permitido aportar argumentos adicionales en favor del impacto de la vitamina K en el metabolismo óseo y, en particular, en la constitución y la preservación de la masa ósea (Booth *et al.*, 2000; Shiraki *et al.*, 2000; Braam *et al.*, 2003; Hirano e Ishi, 2002).

35 Al contrario que en el adulto, existen pocos datos disponibles en cuanto a los efectos benéficos de la vitamina K en el metabolismo óseo del niño. Solamente se sabe que es esencial optimizar la masa ósea durante el periodo de crecimiento, con el fin de constituir una reserva ósea máxima y proteger al adulto contra el riesgo de osteoporosis futura.

40 En cualquier caso, se desprende del conjunto de los datos disponibles actualmente que la mejora del contenido de vitamina K de los productos alimenticios es una vía particularmente interesante y prometedora para permitir que el individuo construya y mantenga una buena constitución ósea.

45 En este contexto, ya existen unos productos industriales en el mercado alimentario que contienen una cantidad notable de vitamina K. Se pueden citar en particular ciertos productos lácteos que contienen bacterias lácticas, tales como "Petits Gervais aux Fruits" vendidos en Francia por el solicitante. Sin embargo, se observará que, por un lado, el contenido de vitamina K de estos productos depende generalmente del tipo de fermentos utilizados y, por otro lado, las cepas de *Lactococcus lactis* utilizadas habitualmente en los productos lácteos no producen una cantidad suficiente de vitamina K para satisfacer realmente las necesidades de la población, o incluso para ayudar a aliviar eventuales carencias de vitamina K.

50 Por lo tanto, existe una necesidad en el estado actual de la técnica de productos alimenticios, en particular de productos fermentados y/o de productos lácteos frescos, que contienen vitamina K en cantidades suficientes para contribuir a satisfacer las necesidades y, si es necesario, para corregir las carencias, tanto en el niño y en el adolescente, como en el adulto y las personas de la tercera edad.

55 En la continuación de la descripción, los términos "vitamina K2" y "vitamina K" se utilizan de manera indiferente para designar la vitamina K2.

60 La presente invención por lo tanto prevé responder a esta necesidad proponiendo preparar unos productos alimenticios, en particular unos productos fermentados y/o unos productos lácteos frescos, utilizando nuevas variantes de cepas de bacterias lácticas que producen unas cantidades de vitamina K significativamente superiores a las producidas por las cepas de las cuales se derivan.

65

Además, en el curso de sus estudios, los inventores han puesto a punto unas condiciones de utilización de las bacterias lácticas que favorecen de manera sustancial la producción de vitamina K con respecto a las condiciones de producción habituales. Así, con el fin de preparar productos alimenticios, tales como productos fermentados y/o productos lácteos frescos, enriquecidos con vitamina K2, se podrá utilizar ventajosamente las variantes "superproductoras" de vitamina K que constituyen el objeto de la presente invención en las condiciones de utilización identificadas por los inventores como particularmente favorables para la producción de vitamina K y que constituyen el objeto de la solicitud de patente francesa nº 06/08690 del 4 de octubre de 2006.

El equipo de Morishita et al. (J. Dairy Science, 1999) ha descrito unas cepas de bacterias lácticas que producen vitamina K2 ("menaquinona"). Los autores no proponen utilizar un medio de cultivo que contiene bacitracina o un agente oxidante. Por lo tanto, las bacterias descritas no son resistentes a estos agentes.

La solicitud JP 2000-287676 describe un procedimiento de obtención de una variante natural de una cepa de bacteria de la especie *Bacillus Nato* que produce vitamina K2. Este procedimiento no utiliza ningún medio selectivo que contiene bacitracina o un agente oxidante.

El término "variante" cubre en la presente memoria:

- las variantes naturales, es decir, obtenidas de manera espontánea de una cepa de bacteria láctica de referencia bajo el efecto de una presión de selección; las variantes naturales que no experimentan ninguna manipulación genética, pero que se obtienen principalmente por mutación y selección a partir de la cepa de referencia; y
- los mutantes que comprenden una o varias mutaciones en su genoma, que han sido inducidas por ingeniería genética, es decir, mediante unas técnicas de mutagénesis dirigida, en particular por transformación genética con la ayuda de vectores, aplicadas a la cepa de referencia.

Se observará que, en ciertos países (en particular en Europa), se deben tomar precauciones por parte de la industria alimentaria cuando desarrollan productos destinados a la alimentación humana y/o animal, en los que se incorporan microorganismos, más particularmente microorganismos vivos. En efecto, los organismos (en este caso, microorganismos) genéticamente modificados (OGM o mutantes) pueden suscitar temor y aprensión en los consumidores. Esta imagen negativa que sufren los OGM en ciertos países es tal que el público tiene tendencia a "boicotear" alimentos que contienen OGM. Así, en un contexto donde los consumidores exigen continuamente más transparencia a nivel de los contenidos de los productos alimenticios que les son propuestos y del origen de los ingredientes que estos productos contienen, los productores pueden motivarse para proponer productos casi exclusivamente, o incluso exclusivamente, sin OGM. En el contexto de la presente invención, por lo tanto puede ser ventajoso que los productos alimenticios procedentes de la industria y que contienen microorganismos se preparen utilizando exclusivamente cepas naturales o variantes naturales de cepas naturales.

Según un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para seleccionar una variante natural de una bacteria láctica que produce, en unas condiciones de fermentación estándar, una cantidad de vitamina K2 superior, en un factor por lo menos igual a aproximadamente 1,2, a la producida por dicha cepa de bacteria láctica cultivada en las mismas condiciones, comprendiendo dicho procedimiento por lo menos:

- a) el cultivo de dicha cepa de bacteria láctica en unas condiciones de fermentación estándar, en un medio de selección elegido de entre los medios de cultivo que contienen bacitracina o un agente oxidante tal como el peróxido, que induce una modificación del estado de óxido-reducción celular; y
- b) la selección de dicha variante si produce por lo menos aproximadamente 1,2 veces más vitamina K2 que dicha cepa de bacteria láctica cultivada en las mismas condiciones.

Las "variantes" son, en el sentido de la invención, unas cepas de bacterias lácticas capaces de producir más vitamina K2 que las cepas de las que proceden. De manera más precisa, las variantes según la presente invención son capaces de producir por lo menos aproximadamente 1,2 veces más vitamina K2 que las cepas de partida. Preferentemente, la cantidad de vitamina K2 producida por una variante de acuerdo con la presente invención es superior, en un factor por lo menos igual a aproximadamente 1,5, a la obtenida cultivando la cepa de bacteria láctica de partida en las mismas condiciones de fermentación estándar. Este factor es, de manera más preferida, por lo menos igual a aproximadamente 1,7, más preferentemente por lo menos igual a aproximadamente 1,8, y más preferentemente aún por lo menos igual a aproximadamente 1,9. Unos valores de este factor todavía más preferidos son de por lo menos 2; 2,2; 2,4; 2,5; 2,7; 2,8; 2,9; y 3.

Las cepas de bacterias lácticas "de referencia" o "de partida" son las cepas a partir de las cuales se obtienen las variantes según la invención. Estas cepas pueden ser naturales o pueden ser a su vez unas variantes, es decir, unas variantes naturales o unos mutantes.

En el marco de la presente invención, las "condiciones de laboratorio" son unas condiciones de fermentación

completamente estándar y bien conocidas por el experto en la materia. Así, las expresiones "condiciones de laboratorio" y "condiciones de fermentación estándar" son completamente sinónimas en la presente memoria. Las "condiciones de laboratorio" preferidas en el sentido de la presente invención son las siguientes: se realiza un precultivo de la cepa en medio comercial M17 (Difco™ M17) o en un medio equivalente. Para el cultivo siguiente, la inoculación se realiza al 1% con ayuda del procedimiento. La temperatura de incubación es aproximadamente 30°C. Se considerará que las condiciones de laboratorio pueden ser modificadas si es necesario por el experto en la materia, en base a sus conocimientos generales y, eventualmente, después de los experimentos de puesta a punto de rutina. El medio de cultivo es un medio apropiado para cultivar las cepas de bacterias lácticas, en particular las cepas de *Lactococcus* spp.

Según un modo de realización preferido, la cepa de bacteria láctica se elige de entre los géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Propionibacterium*. Particularmente se elige de entre las especies *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum*, *Enterococcus faecium*, y *Propionibacterium* sp.

Tal como se desarrolla en la continuación de la descripción, en el procedimiento según la invención, se utiliza un medio de selección elegido de entre los medios de cultivo que contienen bacitracina o un agente oxidante tal como el peróxido.

El medio de selección así utilizado permite inducir una modificación del estado de óxido-reducción de la célula. Ventajosamente, esta modificación está correlacionada con la modificación, en dicha variante y en comparación con la cepa de bacteria láctica de la que procede, de la expresión de por lo menos un gen elegido de entre los genes 1 a 27 listados en la Tabla I siguiente:

Tabla I

nº del gen	Nombre del gen	Función de la proteína correspondiente	nº de acceso NCBI.
1	cys D	O-acetilhomoserina sulfhidrilasa	Iimg_0091
2	gpo	Proteína gpo (glutation peroxidasa)	Iimg_1088
3	metE	5-metiltetrahydropteriltriglutamato-homocisteína metiltransferasa	Iimg_1225
4		Deshidrogenasa NADH putativa	Iimg_0195
5	metF	Proteína MetF metileno tetrahidrofolato reductasa	Iimg_1226
6	trxH	Tioredoxina tipo H	Iimg_0406
7	fur	Proteína de regulación de la asimilación férrica	Iimg_1023
8	qor	Quinona oxidoreductasa	Iimg_1850
9	frdc	Subunidad de flavoproteína fumarato reductasa	Iimg_1441
10	adhE	Alcohol-acetaldehído deshidrogenasa	Iimg_2432
11	purC	Fosforibosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintasa	Iimg_0973
12	cydB	Citocromo d ubiquinol oxidasa, subunidad II	Iimg_1863
13	purE	Subunidad catalítica fosforibosilaminoimidazol carboxilasa	Iimg_0999
14	purQ	Fosforibosilformilglicinamida sintasa I	Iimg_0975
15	trxA	Tioredoxina	Iimg_0779
16	noxB	Deshidrogenasa NADH	Iimg_1734
17	cpo	Cloruro de peroxidasa no hemo	Iimg_1737
18	metK	Proteína MetK S-adenosilmetionina sintasa	Iimg_2160
19	trxB1	Proteína TrxB1 tioredoxina reductasa	Iimg_1588
20	cysK	O-acetilserina sulfhidrilasa	Iimg_1775
21	metC	Cistationina beta-liasa	Iimg_1776
22	metS	Proteína MetS Metionil-ARNt sintetasa	Iimg_1764
23	feoB	Homólogo de la proteína B de transporte de hierro ferroso	Iimg_0199
24	citB	Aconitato hidratasa	Iimg_0636
25	icd	Isocitrato deshidrogenasa	Iimg_0637
26	fhuD	Proteína afín del sustrato del sistema de transporte ABC del ferricromo	Iimg_0349
27	ldh	L-lactato deshidrogenasa	Iimg_1120

Preferentemente, la expresión de los genes nº 1 a 27 está modificada en dicha variante con respecto a la cepa de la bacteria láctica.

Por "modificación de la expresión de un gen" se entiende en la presente memoria que la expresión del gen considerado está modificada cuantitativamente con respecto a la observada en la cepa de bacteria láctica de partida:

- o bien aumenta la expresión, y esto será preferentemente el caso para por lo menos un gen elegido de entre los genes nº 1 a 15;

- o bien se reduce la expresión, y esto será preferentemente el caso para por lo menos un gen elegido de entre los genes nº 16 a 27.

5 Preferentemente, la variante se selecciona en la etapa b) si produce, en unas condiciones de fermentación estándar:

- por lo menos aproximadamente 1,5 veces más, preferentemente por lo menos aproximadamente 2 veces más, aún más preferentemente por lo menos aproximadamente 3 veces más vitamina K2 que el fermento CHN-12; y/o

10 - por lo menos aproximadamente 1,5 veces más, preferentemente por lo menos aproximadamente 2 veces más, aún más preferentemente por lo menos aproximadamente 3 veces más y ventajosamente hasta aproximadamente 10 veces más vitamina K2 que la cepa natural modelo MG1363.

15 Ventajosamente, la variante se selecciona en la etapa b) si produce, en unas condiciones de fermentación estándar, por lo menos aproximadamente 5,5 µg de vitamina K2 por 100 g de leche fermentada.

Si la cantidad de vitamina K2 producida por las variantes es por lo menos aproximadamente 5,5 µg por 100 g de leche fermentada en unas condiciones experimentales estándar, se puede hablar de variante "superproductora" de vitamina K2. En particular, una variante en el sentido de la presente invención produce por lo menos aproximadamente 5,7 µg, aún más preferentemente por lo menos aproximadamente 5,9 µg, y aún más preferentemente por lo menos aproximadamente 6,1 µg y, mejor aún, por lo menos aproximadamente 6,3 µg de vitamina K2 por 100 g de leche fermentada en unas condiciones de fermentación estándar. Más preferentemente, una variante según la presente invención produce por lo menos aproximadamente 6,5 µg, preferentemente por lo menos aproximadamente 7 µg, preferentemente aún por lo menos aproximadamente 7,5 µg, aún más preferentemente por lo menos aproximadamente 8 µg, aún más preferentemente 8,5 µg, aún más preferentemente por lo menos aproximadamente 9 µg y mejor aún, por lo menos aproximadamente 9,5 µg, y mejor aún, por lo menos aproximadamente 10 µg de vitamina K2 por 100 g de leche fermentada en unas condiciones de fermentación estándar.

30 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una variante natural de una cepa de bacteria láctica resistente a la bacitracina o a un agente oxidante tal como el peróxido, susceptible de ser obtenido mediante un procedimiento tal como el descrito anteriormente, así como a los cultivos y fracciones de cultivos biológicamente puras de dicha variante, produciendo dicha variante, en unas condiciones de fermentación estándar, una cantidad de vitamina K2 superior, en un factor por lo menos igual a aproximadamente 1,2, a la producida por la cepa de bacteria láctica de partida cultivada en las mismas condiciones.

35 En particular, una variante de acuerdo con la presente invención produce, en unas condiciones de laboratorio (o condiciones de fermentación estándar):

- por lo menos aproximadamente 1,5 veces más, preferentemente por lo menos aproximadamente 2 veces más, preferentemente aún por lo menos aproximadamente 3 veces más vitamina K2 que el fermento CHN-12 comercializado por CHR. Hansen A/S (Horsholm, DK); y/o

45 - por lo menos aproximadamente 1,5 veces más, preferentemente por lo menos aproximadamente 2 veces más, aún más preferentemente aproximadamente 3 veces más y, ventajosamente hasta por lo menos aproximadamente 10 veces más, vitamina K2 que la cepa natural modelo *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 depositada en el CBS (Baarn, NL) bajo el número CBS 364.89. Esta cepa modelo de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* es perfectamente conocida por el experto en la materia. Ha sido descrita por primera vez por Gasson en 1983 (Gasson M., 1983).

De acuerdo con la definición de "variante natural" dada arriba, una variante según la presente invención es una variante natural obtenida por presión de selección en un medio de cultivo apropiado.

55 Varios ejemplos de dichas variantes naturales obtenidas por presión de selección se proporcionan en la presente solicitud. Brevemente (para más detalle, véase la parte "Ejemplos" a continuación), unos ejemplos preferidos de variantes naturales y procedimientos para obtenerlas son los siguientes.

60 Según un primer modo de realización, una variante natural de acuerdo con la invención se obtiene por presión de selección en un medio de cultivo que contiene bacitracina. En función de las cepas de partida, la concentración de bacitracina en el medio puede ser, por ejemplo, de por lo menos aproximadamente 0,4 mg/l, preferentemente de por lo menos aproximadamente 1 mg/l, aún más preferentemente por lo menos aproximadamente 2 mg/l, y aún más preferido de por lo menos aproximadamente 3 mg/l y en la manera más preferida de todas, de por lo menos aproximadamente 4 mg/l. Sin embargo, está claro para el experto en la materia que la concentración de bacitracina a utilizar para obtener unas variantes naturales de acuerdo con la invención se determinará en función del nivel de resistencia a la bacitracina de la cepa de bacteria láctica utilizada al principio. Si es necesario, el experto en la

materia trabajará con varias concentraciones diferentes elegidas en función de las propiedades de la cepa de partida. Ventajosamente, el experto en la materia podrá trabajar con rangos de concentraciones de bacitracina.

5 Una variante natural particularmente interesante tiene esencialmente las mismas propiedades biológicas que la variante natural I-3557, depositada en la Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos (CNCM, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia) el 20 de enero de 2006.

10 Por la expresión "una variante A presenta esencialmente las mismas propiedades biológicas que la variante natural I-3557", se entiende en la presente memoria que la variante A es una variante natural obtenida por presión de selección en un medio que contiene bacitracina. Sin embargo, la concentración de bacitracina utilizada en el medio para obtener la variante A no es determinante para cumplir la presente definición. La condición determinante, por el contrario, es que la variante A sea capaz de producir, en las condiciones de laboratorio, aproximadamente tanta, preferentemente por lo menos tanta vitamina K2 como la variante I-3557. Una variante natural en el sentido de la invención es preferentemente variante natural I-3557.

15 En un segundo modo de realización, una variante natural según la presente invención se obtiene por presión de selección en un medio de cultivo que contiene por lo menos un agente oxidante. Por ejemplo, el agente oxidante se puede seleccionar de entre el peróxido, los iones perclóricos, los iones ferrosos, la menadiona, el paraquat, el oxígeno o cualquier otro compuesto oxidante apropiado. Preferentemente, el oxidante es peróxido. Como con bacitracina, la concentración de peróxido en el medio se determina en función de la cepa de bacteria láctica de partida. Por ejemplo, se podrán ensayar una o varias concentraciones de peróxido en los siguientes rangos: por lo menos aproximadamente 20, 25, 27, 28,5 mg/l. De nuevo, el experto en la materia determinará una o varias concentraciones, e incluso varios rangos de concentraciones apropiados, de peróxido que se probarán experimentalmente de la manera usual.

25 Ventajosamente, una variante natural de acuerdo con la invención tiene esencialmente las mismas propiedades biológicas que la variante natural I-3558 (depositada en la CNCM el 20 de enero de 2006). La definición de la expresión "una variante A que presenta esencialmente las mismas propiedades biológicas que la variante natural I-3557" dada anteriormente, se aplica en este caso *mutatis mutandis* (peróxido en lugar de bacitracina; variante I-3558 en lugar de la variante I-3557). Preferentemente, una variante de este tipo es la variante natural I-3558.

30 Un tercer aspecto de la presente invención prevé unas utilizaciones de condiciones de selección particulares para seleccionar unas variantes naturales de cepas de bacterias lácticas que, de acuerdo con la descripción precedente, producen, en unas condiciones de fermentación estándar, por lo menos aproximadamente 1,2 veces más vitamina K2 que las cepas de partida cultivadas en las mismas condiciones.

Estas utilizaciones son en particular:

- 40
- la utilización de la resistencia a la bacitracina; y/o
 - la utilización de la resistencia a un agente oxidante, tal como el peróxido.

45 Como se ha indicado anteriormente, dichas variantes naturales son ventajosamente capaces de producir por lo menos aproximadamente 5,5 µg de vitamina K2 por 100 g de leche fermentada en unas condiciones de fermentación estándar.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un fermento láctico que comprende por lo menos una variante tal como se ha descrito *supra*.

50 Según un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de producción de un producto alimenticio enriquecido con vitamina K2, que comprende por lo menos:

- a) utilizar por lo menos una variante y/o por lo menos un fermento tal(es) como se ha(n) descrito anteriormente, en una preparación intermedia de dicho producto; y
- 55 b) obtener dicho producto enriquecido con vitamina K2.

Alternativamente, un proceso para aumentar el contenido de vitamina K2 de un producto alimenticio comprende por lo menos:

- 60 a) utilizar por lo menos una variante y/o por lo menos un fermento tal(es) como se ha(n) descrito anteriormente, en una preparación intermedia de dicho producto; y
- b) obtener dicho producto enriquecido con vitamina K2.

65 Las variantes y/o el fermento láctico en particular pueden ser realizados utilizando unos concentrados de bacterias precultivadas *in situ* (en el sitio de producción de los productos alimenticios), o utilizando unas bacterias

5 precultivadas por un proveedor de fermentos, después y después acondicionados y expedidos hacia el o los sitios de producción de los productos alimenticios. Los proveedores pueden acondicionar las bacterias en el estado fresco o congelado; alternatively, las bacterias se pueden secar o liofilizar. Las bacterias, en todos los casos, se añaden a la masa láctea en una manera completamente convencional (como cualquier otro fermento láctico conocido).

10 Un sexto aspecto de la presente invención se refiere a un producto alimenticio enriquecido con vitamina K2 que comprende por lo menos una variante según la invención y/o por lo menos un fermento según la invención, que se puede obtener mediante un procedimiento tal como el descrito anteriormente. La invención se refiere a los productos alimenticios para el ser humano y/o el animal, con una preferencia por los productos destinados a la alimentación humana. Ventajosamente, dicho producto alimenticio enriquecido con vitamina K2 refuerza la solidez de los huesos de la persona que lo consume. Preferentemente, esta persona es un niño.

15 Preferentemente, un producto alimenticio en el sentido de la invención se elige de entre los productos fermentados, los productos lácteos frescos fermentados o no, los productos a base de zumos de origen vegetal (frutas, hortalizas, cereales, soja, etc.) fermentados o no, y sus combinaciones. De una manera más particularmente preferida, un producto alimenticio en el sentido de la invención es un producto fermentado y/o un producto lácteo fresco.

20 En el contexto de la invención, los "productos lácteos frescos" designan más particularmente productos lácteos frescos y fermentados, listos para el consumo humano, es decir, alimentos lácteos frescos y fermentados. En la presente solicitud, se prevén más particularmente las leches fermentadas y yogures. Dichos alimentos lácteos frescos y fermentados pueden ser alternatively quesos blancos o petit-suisse.

25 A los términos "leches fermentadas" y "yogures" se les dan sus significados usuales en el campo de la industria láctea, es decir, de los productos que están destinados al consumo humano y que proceden de la fermentación láctica acidificante de un sustrato lácteo. Estos productos pueden contener ingredientes secundarios tales como frutas, vegetales, azúcar, etc. Por ejemplo, se puede hacer referencia al decreto francés 88-1203 del 30 de diciembre de 1988 que se refiere a las leches fermentadas y yogures, publicado en el Journal Officiel de la République Française del 31 de diciembre de 1988.

30 También se puede hacer referencia al "Codex Alimentarius" (preparado por la comisión del Codex Alimentarius bajo el auspicio de la FAO y de la OMS, y publicado por división de información de la FAO, disponible en línea en <http://www.codexalimentarius.net>; véase más particularmente el volumen 12 del Codex Alimentarius "Normes Codex pour le lait et les produits laitiers" y la norma "CODEX STAN A-1 1(a)-1975").

35 La expresión "leche fermentada" se reserva así en la presente solicitud al producto lácteo preparado con un sustrato lácteo que ha experimentado un tratamiento por lo menos equivalente a la pasteurización, inoculado con unos microorganismos que pertenecen a la o a las especies característica(s) de cada producto. Una "leche fermentada" no ha experimentado ningún tratamiento que permita eliminar un elemento constitutivo del sustrato lácteo utilizado, y en particular no ha sufrido un escurrido del coágulo. La coagulación de las "leches fermentadas" no se debe obtener por medios diferentes a los que resultan de la actividad de los microorganismos utilizados.

45 El término "yogur" se reserva para la leche fermentada obtenida, según los usos locales y constante, por el desarrollo de bacterias lácticas termófilas específicas denominadas *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, que deben estar vivas en el producto acabado, a razón de por lo menos 10 millones de bacterias por gramo con respecto a la parte láctea.

50 En ciertos países, la reglamentación permite la adición de otras bacterias lácticas en la producción de yogur, y en particular el uso adicional de cepas de *Bifidobacterium* y/o *Lactobacillus acidophilus* y/o *Lactobacillus casei*. Estas cepas lácticas adicionales están destinadas a conferir varias propiedades al producto acabado, tales como la de favorecer el equilibrio de la flora intestinal o modular el sistema inmunitario.

55 En la práctica, la expresión "leche fermentada" se utiliza generalmente para designar por lo tanto las leches fermentadas diferentes del yogur. Pueden tener varios nombres, según el país, tan diversos como, por ejemplo "Kefir", "Kumis", "Lassi", "Dahi", "Leben", "Filmjöl", "Villi", "Acidophilus milk".

60 Al tratarse de leches fermentadas, la cantidad de ácido láctico libre contenida en el sustrato lácteo fermentado no debe ser inferior a 0,6 g por 100 g en el momento de la venta al consumidor, y el contenido de materia proteica aportada a la parte láctea no debe ser inferior al de una leche normal.

65 Por último, la denominación "queso blanco" o "petit-suisse", en la presente solicitud, se reserva para un queso sin afinar, no salado, que ha sufrido una fermentación solamente por bacterias lácticas (y ninguna otra fermentación que la fermentación láctica). El contenido en materia seca de los quesos blancos se puede disminuir a 15 g o 10 g por 100 g de queso blanco, según que su contenido de materias grasas es superior a 20 g o como máximo igual a 20 g por 100 g de queso blanco, después de desecación completa. El contenido de materia seca de un queso blanco está comprendido entre 13 y 20%. Por su parte, el contenido de materia seca de un petit-suisse no es inferior a 23 g por

100 g de petit-suisse. Generalmente está comprendido entre 25 y 30%. Los quesos blancos y petit-suisse generalmente se agrupan bajo el nombre "quesos frescos", utilizado de manera habitual en el campo técnico de la presente invención.

5 En un séptimo aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de por lo menos una variante y/o por lo menos un fermento como se ha descrito anteriormente, para preparar un producto alimenticio enriquecido con vitamina K2.

10 Ventajosamente, dicho producto alimenticio enriquecido con vitamina K2 refuerza la solidez de los huesos de la persona que lo consume. Preferentemente, esta persona es un niño.

Está claro que la presente invención no se limita a la descripción anterior. Otros modos de realización y ventajas de la invención se desprenderán de la lectura de los ejemplos siguientes, proporcionados a título puramente ilustrativo.

15 Ejemplos

A título de observaciones preliminares, se debe observar que los protocolos de obtención de variantes naturales descritas a continuación son aplicables a cualquier tipo cepa de bacteria láctica de partida. En función de las cepas de partida que utilizará el experto en la materia, por razones esencialmente prácticas, podrá modificar ciertas condiciones experimentales puestas a punto por los inventores. En cualquier caso, las modificaciones que el experto en la materia podrá introducir a los procedimientos siguientes serán menores y solamente necesitarán simples manipulaciones de rutina que no implican ninguna actividad inventiva.

25 I - Obtención y utilización de variantes naturales resistentes a bacitracina

Aunque una exposición a agentes tales como bacitracina o peróxido sea conocida para permitir seleccionar cepas bacterianas que tienen una resistencia incrementada a estos agentes, nunca se ha establecido ninguna relación en la bibliografía entre la resistencia a la bacitracina o al peróxido y los niveles de producción de vitamina K2 por las bacterias.

30 En el marco de sus trabajos, los inventores han descubierto de una manera completamente inesperada que las bacterias eran capaces de desarrollar un mecanismo original de resistencia a ciertos agentes tales como la bacitracina o el peróxido, que implica un aumento de la producción de vitamina K2. Los inventores han previsto aprovechar este descubrimiento con el fin de obtener, utilizando la bacitracina o el peróxido como agentes de selección, variantes naturales de cepas de bacterias lácticas (en particular *Lactococcus lactis*) capaces de superproducir vitamina K2.

I-1 Protocolo de obtención de variantes resistentes a la bacitracina

40 Se ha realizado un precultivo a partir de un cristal de una cepa natural de *Lactococcus lactis* en presencia de 2 ml de medio de cultivo convencional comercial M17 (medio M17, Difco™) adicionado con 5 g/l de lactosa (en lo sucesivo, medio M17 Lac) y con hemina (20 µl/ml) (en lo sucesivo, medio M17 Lac + hemina). La incubación se ha realizado bajo agitación a 30°C.

45 El precultivo ha servido para inocular 2 ml de M17 Lac + hemina suplementado con bacitracina (4 µg/ml). La tasa de inoculación era de 1%. El cultivo se ha incubado a continuación durante 48 h bajo agitación a 30°C.

50 Después, se han depositado sobre una gelosa de M17 Lac 100 µl de esta suspensión. Un disco de papel embebido con 2,5 mg de bacitracina se ha depositado en el centro de la caja. La gelosa se ha incubado durante 48 h a 30°C. Los clones cercanos al disco de papel se han cultivado en presencia de bacitracina (4 µg/ml) en 2 ml de M17 Lac + hemina. La incubación ha durado 24 h bajo agitación a 30°C.

55 Se han aislado las células sobre gelosa M17 Lac en presencia de bacitracina (2 µg/ml) después de una incubación de 48 h a 30°C. Los clones aislados se han cultivado en M17 Lac + hemina, y después incubado durante 24 h bajo agitación a 30°C. Esta suspensión ha servido para la elaboración de la reserva congelada.

Estos experimentos han permitido a los inventores seleccionar la variante natural *Lactococcus lactis subsp. cremoris* I-3557 depositada en la CNCM el 20 de enero de 2006.

60 I-2 Protocolo de realización de un ejemplo de producto lácteo con la variante "bacitracina"

Se ha realizado un precultivo a partir de un cristal de la cepa en 2 ml de M17 Lac.

65 El precultivo ha servido para inocular, al 1%, 50 ml de leche entera UHT que se ha incubado a 30°C durante 24 h.

La Tabla II siguiente da el resultado de la dosificación de vitamina K2 expresada en µg equivalente MK-4/100 g de

producto, para la variante resistente a bacitracina y la cepa salvaje correspondiente.

Tabla II

Cepa	I-3557	Salvaje
Vitamina K (en µg/100 g)	8,90	3,32

5 La variante resistente a bacitracina superproduce por lo tanto, a razón de un factor de 3, la vitamina K en comparación con la cepa salvaje de partida.

10 II - Obtención y utilización de variantes naturales resistentes al peróxido

10 La respiración de *Lactococcus lactis* se descubrió de manera bastante reciente (Dawat *et al.*, 2001). La secuenciación del genoma de una cepa de *L. lactis* (IL1403) confirmó la presencia de genes que codifican las funciones necesarias para respiración aeróbica (Bolotin *et al.*, 2001). De hecho, *L. lactis* tiene los operones *men* y *cytABCD* que codifican las proteínas necesarias para la síntesis de menaquinona y para la biogénesis del citocromo D. Esta especie también tiene tres genes implicados en las últimas etapas de síntesis de hemo (*hemH*, *hemK* y *hemN*, que se requieren en la oxidación de la porfirina para unir hierro al hemo), pero no tiene los genes implicados en las primeras etapas de este proceso. Sin embargo, *L. lactis* es capaz de realizar una fosforilación oxidativa en presencia de protoporfirinógeno.

20 También se demostró que *L. lactis* podía respirar en presencia de oxígeno y de hemo en el medio de cultivo. Esta respiración permite que las células alcancen una biomasa más grande y el pH final observado es más alto que el obtenido habitualmente. Unos cultivos en presencia de oxígeno y/o de hemo permiten obtener unas curvas de crecimiento comparables durante aproximadamente las primeras 6 o 7 horas de fermentación. A continuación, el consumo de glucosa disminuye en el caso de los cultivos en presencia de oxígeno y de hemo, y la producción de lactato es entonces menor. Esto traduce un cambio de metabolismo que se produce de manera tardía durante el cultivo. La respiración de *L. lactis* se realiza por lo tanto hacia el final de la fase exponencial de crecimiento (Dawat *et al.*, 2001).

30 El papel de la respiración de *L. lactis* aún no se conoce, ni tampoco el papel que puede tener la vitamina K2 en esta especie con metabolismo más bien fermentador. Los inventores han constatado por otra parte que la vitamina K2 era producida por cepas de *L. Lactis* mientras que la respiración no era inducida en las condiciones ensayadas (sin hemo en el medio y sin agitación que permiten una buena oxigenación del medio).

35 En el citoplasma, las proteínas sólo presentan pocos puentes de disulfuro, contrariamente a las proteínas extracelulares. Existe un sistema enzimático ampliamente extendido que permite limitar el número de puentes de disulfuro. Los enlaces S-S son reducidos en función SH por medio de una enzima, la tioredoxina. Esta enzima es regenerada por la tioredoxina reductasa. Vido *et al* (2005) crearon por ingeniería genética un mutante *trxB1* de *L. lactis*. El gen *trxB1* codifica para la tioredoxina reductasa. El estudio por electroforesis bidimensional de las proteínas sintetizadas por este mutante ha demostrado que superproducía ciertas enzimas de la vía de síntesis de la vitamina K2, a saber, las enzimas MenB y MenD.

45 A la vista de estos datos así como según las observaciones personales, los inventores han supuesto que una de las vías posibles para mejorar la producción de vitamina K2 por *L. lactis* podría ser inducir la respiración. Otra vía podría ser tratar de movilizar la vitamina K2 para responder a un estrés oxidativo.

Los inventores por lo tanto han intentado obtener unas variantes naturales resistentes a un estrés oxidativo. Es importante observar que las variantes naturales obtenidas no mostraban ninguna sobreexpresión del operón Men.

50 I-11 Protocolo de obtención de variantes resistentes a un estrés oxidativo

Se ha elegido el peróxido como ejemplo de agente oxidante que se puede utilizar. Evidentemente, otros agentes oxidantes tales como los iones perclóricos, los iones ferrosos, la menadiona, el paraquat, el oxígeno o cualquier otro compuesto oxidante apropiado, se podrían utilizar en unas condiciones similares.

55 Después de un precultivo en medio M17 Lac, las cepas naturales de partida se trasplantan en el mismo medio que contiene unas concentraciones crecientes de peróxido (por ejemplo, un rango comprendido entre por lo menos 20 y por lo menos 25, 27, 28,5 mg/l aproximadamente). Los cultivos se incuban a 30°C. Después de 24 h, ya que los primeros tubos del rango de concentración no muestran ningún crecimiento, se reincuban durante 24 h más. Los clones se aíslan a continuación por extracción sobre medio de gelosa. Se selecciona un clon para una concentración de peróxido de 27 mg/l. Los inventores observaron que más allá de una concentración de peróxido de 28,5 mg/l, no había crecimiento.

Estos experimentos permitieron así a los inventores seleccionar la variante natural de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* I-3558 depositada en la CNCM el 20 de enero de 2006.

II-2 Protocolo de realización de un ejemplo de producto lácteo con la variante "peróxido"

5 El clon seleccionado se ha puesto en desarrollo en leche entera durante 24 h. Se extrajeron entonces unas muestras y se congelaron a -80°C para una dosificación posterior de vitamina K.

10 La Tabla III siguiente indica la cantidad de vitamina K2 producida por la variante resistente al peróxido, en comparación con la cantidad producida por la cepa de partida (cantidades expresadas en µg equivalente MK-4/100 g de leche fermentada).

Tabla III

Cepa	Vitamina K (µg/100 g)
Salvaje	2,92 ± 0,45
I-3558	5,94 ± 0,76

15 Como se muestra en la Tabla III anterior, la variante produce aproximadamente dos veces más de vitamina K2 que la cepa salvaje correspondiente.

III - Caracterización genotípica de las variantes naturales I-3557 y I-3558.

III-1-Materiales y métodos

20 Las cepas se cultivan durante una noche a 30°C en medio M17 lactosa. Se inocula leche entera comercial con la ayuda de cada una de estas cepas a razón de 1% de precultivo. La leche inoculada se coloca en tubos de 12 ml. Las fermentaciones se detienen en el estado fisiológico deseado, fase exponencial de crecimiento o fase de ralentización, sumergiendo los tubos en nitrógeno líquido. Los tubos se almacenan entonces a -80°C hasta su
25 utilización. Unos experimentos precedentes habían demostrado que la vitamina K se produce esencialmente en la fase de ralentización (datos no mostrados).

• Extracción de los ARN totales

30 Todas las muestras se tratan de manera idéntica.

Estas muestras se descongelan en presencia de RNA Protect (Qiagen - ref 76506) con el fin de evitar la degradación de los ARN. Las células de estas muestras se recuperan por centrifugación.

35 A continuación, los ARN de las células de cada muestra se aíslan con la ayuda del triturador de células Mixer Mill MM300 (Qiagen) con unas bolas (Biospec Products - ref 11079101z, Zirconia/Silica beads de 0,1 mm de diámetro) y en presencia de Trizol® (Invitrogen - ref 15596-026). La concentración y las proporciones de pureza (230/260 y 260/280 nm) de los ARN se controlan entonces por espectrofotometría con el espectrofotómetro ND-1000 Nanodrop® (Nanodrop Technologies). La calidad de los ARN (RIN, proporción 16/23 S) también se controla con la
40 ayuda del programa experto - 2100 Bioanalyzer, versión B.02.05 (Agilent Technologies) y Kits ARN 6000 Series II Nano (Agilent Technologies - ref 5067-1511).

• Marcajes de los ARNm e hibridaciones en chip de ADN

45 Las dianas se sintetizan por transcripción inversa de los ARNm utilizando los mismos cebadores inversos específicos que los utilizados para la síntesis de los productos PCR manchados en los chips de ADN. Estos marcajes directos han sido realizados por la compañía Eurogentec con la ayuda del kit CyScribe first strand cDNA labelling system dCTP/purification CyScribe GFX (Amersham - ref RPN6202X) y de moléculas fluorescentes acopladas a nucleótidos Cy3-dCTP/Cy5-dCTP (Perkin Elmer - ref NEL576/NEL577).

50 Las hibridaciones de las dianas marcadas en el chip de ADN de productos PCR, de la cepa de *Lactococcus lactis cremoris* MG1363 (secuencia disponible en el NCBI), han sido realizadas por la compañía Eurogentec, que produce y vende estos chips de ADN. Esta compañía utiliza un protocolo de hibridación y lavado convencional (tampón de hibridación Eurogentec - ref AR-HYB-01, incubación de una noche a 42°C en estación de hibridación Advalytix Slidebooster SB800- Implen, lavado de los chips de ADN hibridados en un tampón 0,2X SSC/0,1% SDS durante 5
55 minutos bajo agitación a temperatura ambiente, y después enjuague en un tampón 0,2X SSC durante 5 minutos a temperatura ambiente bajo agitación ocasional, y después secado de los chips de ADN por centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos).

60 La adquisición de los datos de las hibridación ha sido realizada por la compañía Eurogentec con la ayuda de un escáner Axon 4100A y del programa GenePix Pro 5.1 (Axon Instruments). Los escaneados de los chips de ADN hibridados son enviados a continuación a los inventores por la compañía Eurogentec.

• Tratamiento de los datos

Los resultados digitales procedentes de los escaneados de los chips de ADN hibridados han sido obtenidos por los inventores con la ayuda del programa GenePix Pro 6.0.

Estos primeros resultados digitales han seguido un tratamiento estadístico con el programa MANGO, desarrollado por la plataforma Transcriptomique GODMAP del CNRS de Gif sur Yvette (91) para obtener unas proporciones de expresión significativas; cada mancha correspondiente a un gen se duplica en los chips de ADN y cada experimento biológico se reproduce tres veces incluyendo una inversión de los marcajes (DyeSwap) para limitar las tendencias de incorporación de las moléculas fluorescentes acopladas a nucleótidos, representando así seis muestras por comparación.

Las proporciones de expresión diferencial se seleccionan en base a los criterios de reproducibilidad tales como el valor p ajustado ($<0,01$), con respecto al ruido de fondo medio y al valor de las proporciones de expresión ($r \geq 2,00$ y $r \leq -2,00$).

III-2- Resultados

Las dos variantes presentan resultados similares en cuanto a la expresión de ciertos genes. La mayoría de los genes en cuestión tienen relación con el estado de óxido-reducción de la célula y en particular en relación con los grupos Fe-S. En este contexto, se modifica el metabolismo de la metionina y de la cisteína, así como el transporte de hierro. La expresión de varias enzimas implicadas en los mecanismos de defensa de estrés oxidativo se modifica: tioredoxina H, tioredoxina B1, deshidrogenasa NADH, deshidrogenasa NADH, glutatión peroxidasa, etc.

En fase exponencial, ciertas enzimas implicadas en la respiración de *L. Lactis* están sobreexpresadas: fumarato reductasa (*frdC*) y citocromo oxidasa (*cydD*). Del mismo modo, el metabolismo de las bases purinas parece estar modificado.

La Tabla IV siguiente informa de las proporciones de expresión de ciertos genes y establece una comparación entre las variantes y la cepa salvaje en la fase de ralentización.

Tabla IV

Proteína	Gen	nº del gen en la presente solicitud	nº de acceso NCBI	Variante I-3557	Variante I-3558
O-acetilhomoserina sulfidrilasa	cysD	1	Iimg_0091	4,04	3,70
Proteína Gpo (glutatión peroxidasa)	gpo	2	Iimg_1088	3,16	3,73
5-metiltetrahydropterilglutamato-homocisteína metiltransferasa	metE	3	Iimg_1225	2,94	3,12
Deshidrogenasa NADH putativa	_	4	Iimg_0195	2,66	3,77
Proteína MetF Metileno tetrahydrofolato reductasa	metF	5	Iimg_1226	2,44	2,64
Tioredoxina tipo H	trxH	6	Iimg_0406	2,37	2,63
Proteína de regulación de la asimilación férrica	fur	7	Iimg_1023	2,16	4,91
Quinona oxidoreductasa	qor	8	Iimg_1850	2,13	2,35
NADH deshidrogenasa	noxB	16	Iimg_1734	-2,01	-2,42
Cloruro de peroxidasa sin hemo	cpo	17	Iimg_1737	-2,39	-2,52
Proteína MetK S-adenosilmetionina sintasa	metK	18	Iimg_2160	-3,51	-2,07
Proteína TrxB1 Tioredoxina reductasa	trxB1	19	Iimg_1588	-3,62	-2,94
O-acetilserina sulfidrilasa	cysK	20	Iimg_1775	-3,86	-3,54
Cistationina beta-liasa	metC	21	Iimg_1776	-5,02	-5,27
L-lactato deshidrogenasa	ldh	27	Iimg_1120	-10,98	-4,31

La Tabla V siguiente da las proporciones de expresión de los genes en las variantes en comparación con la cepa salvaje en fase exponencial de crecimiento.

Tabla V

Proteína	Gen	nº de gen en la presente solicitud	nº de acceso NCBI	Variante I-3557	Variante I-3558
Subunidad flavoproteína reductasa fumarato	frdC	9	Iimg_1441	6,28	6,52
Alcohol-acetaldehído deshidrogenasa	adhE	10	Iimg_1916	4,36	3,14
Fosforibosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintasa	purC	11	Iimg_0973	3,61	3,13
Citocromo d ubiquinol oxidasa, subunidad II	cydB	12	Iimg_1863	3,15	2,95

Proteína	Gen	nº de gen en la presente solicitud	nº de acceso NCBI	Variante I-3557	Variante I-3558
Subunidad catalítica fosforibosilaminoimidazol carboxilasa	purE	13	Iimg_0999	2,12	2,58
Fosforibosilformilglicinamidina sintasa I	purQ	14	Iimg_0975	2,29	2,42
Tioredoxina	trxA	15	Iimg_0779	3,07	2,19
NADH deshidrogenasa putativa	—	4	Iimg_0195	2,41	2,02
Proteína MetS Metionil-sintetasa ARNt	metS	22	Iimg_1764	-2,49	-2,08
Homólogo de la proteína B de transporte de hierro ferroso	feoB	23	Iimg_0199	-3,42	-2,21
Proteína TrxB1 tioredoxina reductasa	trxB1	19	Iimg_1588	-2,74	-2,58
Aconitato hidratasa	citB	24	Iimg_0636	-3,1	-2,88
Isocitrato deshidrogenasa	icd	25	Iimg_0637	-7,32	-7,16
Proteína afin del sustrato del sistema de transporte ABC del ferricromo	fhuD	26	Iimg_0349	-15,1	-16,80

Referencias

- 5 Bolotin *et al.* 2001. *Genome Research* 11, 731-753
 Duwat *et al.* 2001. *J. Bacteriol.* 183(15), 4509-16
 Morishita *et al.* 1999. *J. Dairy Sci.* 82, 1897-1903
 Parker *et al.* 2003. *Journal of Food Science* 68(7), 2325-2330
 Vido *et al.* 2005. *J. Bact.* 187, 601-10
 Gasson M. 1983. *J. Bact.* 154, 1-9
 10 Hart JP, *et al.* [letter]. *Lancet.* 1984;2:283
 Hart JP, *et al.* *J Clin Endocrinol Metab.* 1985;60:1268-9
 Hauschka PV, *et al.* *Physiol Rev.* 1989;69:990-1047
 Ducey P, *et al.* *Nature.* 1996;382:448-52
 Väänänen HK, *et al.* *Calcif Tissue Int.* 1999;64:S79
 15 Ronden JE, *et al.* *Biochim Biophys Acta.* 1998;1379:16-22
 Knapen MH, *et al.* *Ann Intern Med.* 1989 Dec 15;111(12):1001-5
 Szulc P, *et al.* *J Clin Invest.* 1993 Apr;91 (4):1769-74
 Booth SL, *et al.* *Am J Clin Nutr.* 2000;71:1201-8
 Shiraki M, *et al.* *J Bone Miner Res.* 2000;15:515-21
 20 Braam LAJLM, *et al.* *Calcif Tissue Int.* 2003 Jul;73(1):21-6
 Hirano J and Ishii Y. *J Orthop Sci.* 2002; 7:364-369.
 Tsukamoto Y, *et al.* *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001; 65(9):2007-2015
 Coccagn-Bousquet, M., *et al.* *Journal of Applied Bacteriology* 1995; 79, 108-116

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de selección de una variante natural de una cepa de bacteria láctica que produce, en unas condiciones de fermentación estándar, una cantidad de vitamina K2 superior, en un factor por lo menos igual a 1,2, a la producida por dicha cepa de bacteria láctica cultivada en las mismas condiciones, comprendiendo dicho procedimiento por lo menos:
- 5 a) el cultivo de dicha cepa de bacteria láctica en unas condiciones de fermentación estándar, en un medio de selección seleccionado de entre medios de cultivo que contienen bacitracina o un agente oxidante tal como el peróxido, que induce una modificación del estado de óxido-reducción celular; y
- 10 b) la selección de dicha variante si produce por lo menos 1,2 veces más vitamina K2 que dicha cepa de bacteria láctica cultivada en las mismas condiciones.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha cepa de bacteria láctica se selecciona de entre los géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Propionibacterium*.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que dicha cepa de bacteria láctica se selecciona de entre las especies *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum*, *Enterococcus faecium*, y *Propionibacterium sp.*
- 20 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la expresión de por lo menos un gen seleccionado de entre los genes 1 a 27 siguientes:

nº del gen	Nombre del gen	Función de la proteína correspondiente	nº de acceso NCBI.
1	cys D	O-acetilhomoserina sulfhidrilasa	Iimg_0091
2	gpo	Proteína gpo (glutation peroxidasa)	Iimg_1088
3	metE	5-metiltetrahidropteroiltriglutamato-homocisteína metiltransferasa	Iimg_1225
4		NADH deshidrogenasa putativa	Iimg_0195
5	metF	Proteína MetF Metileno tetrahidrofolato reductasa	Iimg_1226
6	trxH	Tioredoxina tipo H	Iimg_0406
7	fur	Proteína de regulación de la asimilación férrica	Iimg_1023
8	gor	Quinona oxidoreductasa	Iimg_1850
9	frdc	Subunidad de flavoproteína fumarato reductasa	Iimg_1441
10	adhE	Alcohol-acetaldehído deshidrogenasa	Iimg_2432
11	purC	Fosforibosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintasa	Iimg_0973
12	cydB	Citocromo d ubiquinol oxidasa, subunidad II	Iimg_1863
13	purE	Subunidad catalítica fosforibosilaminoimidazol carboxilasa	Iimg_0999
14	purQ	Fosforibosilformilglicinamidina sintasa I	Iimg_0975
15	trxA	Tioredoxina	Iimg_0779
16	noxB	Deshidrogenasa NADH	Iimg_1734
17	cpo	Cloruro de peroxidasa no hemo	Iimg_1737
18	metK	Proteína MetK S-adenosilmetionina sintasa	Iimg_2160
19	trxB1	Proteína TrxB1 tioredoxina reductasa	Iimg_1588
20	cysK	O-acetilserina sulfhidrilasa	Iimg_1775
21	metC	Cistationina beta-liasa	Iimg_1776
22	metS	Proteína MetS Metionil-ARNt sintetasa	Iimg_1764
23	feoB	Homólogo de la proteína B de transporte de hierro ferroso	Iimg_0199
24	citB	Aconitato hidratasa	Iimg_0636
25	icd	Isocitrato deshidrogenasa	Iimg_0637
26	fhuD	Proteína afín del sustrato del sistema de transporte ABC del ferricromo	Iimg_0349
27	ldh	L-lactato deshidrogenasa	Iimg_1120

25 está modificada en dicha variante con respecto a dicha cepa de bacterias lácticas.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por que la expresión de por lo menos un gen seleccionado de entre los genes 1 a 15 aumenta en dicha variante con respecto a dicha cepa de bacteria láctica.

30 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, caracterizado por que la expresión de por lo menos un gen seleccionado de entre los genes 16 a 27 se reduce en dicha variante con respecto a dicha cepa de bacteria láctica.

35 7. Variante natural de una cepa de bacteria láctica, resistente a la bacitracina, y que produce, en unas condiciones

de fermentación estándar, una cantidad de vitamina K2 superior, en un factor por lo menos igual a 1,2, a la producida por dicha cepa de bacteria láctica cultivada en las mismas condiciones, caracterizada por que es la variante natural I-3557 depositada en la Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos (CNCM, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia) el 20 de enero de 2006.

5 8. Variante natural de una cepa de bacteria láctica, resistente a un agente oxidante tal como el peróxido, y que produce, en unas condiciones de fermentación estándar, una cantidad de vitamina K2 superior, en un factor por lo menos igual a 1,2, a la producida por dicha cepa de bacteria láctica cultivada en las mismas condiciones, caracterizada por que es la variante natural I-3558 depositada en la Colección Nacional de Cultivo de
10 Microorganismos (CNCM, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia) el 20 de enero de 2006.

15 9. Utilización de la resistencia a la bacitracina para seleccionar unas variantes naturales de cepas de bacterias lácticas que producen, en unas condiciones de fermentación estándar, una cantidad de vitamina K2 superior, en un factor por lo menos igual a 1,2, a la producida por dicha cepa de bacteria láctica cultivada en las mismas condiciones.

20 10. Utilización de la resistencia a un agente oxidante, tal como el peróxido, para seleccionar unas variantes naturales de cepas de bacterias lácticas que producen, en unas condiciones de fermentación estándar, una cantidad de vitamina K2 superior, en un factor por lo menos igual a 1,2, a la producida por dicha cepa de bacteria láctica cultivada en las mismas condiciones.

11. Fermento láctico que comprende por lo menos una variante según cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8.

25 12. Procedimiento de producción de un producto alimenticio enriquecido con vitamina K2 que comprende por lo menos:

30 a) utilizar por lo menos una variante según cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8, y/o por lo menos un fermento según la reivindicación 11, en una preparación intermedia de dicho producto; y

b) obtener dicho producto enriquecido con vitamina K2.

35 13. Producto alimenticio enriquecido con vitamina K2, que comprende por lo menos una variante según cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8, y/o por lo menos un fermento según la reivindicación 11, susceptible de ser obtenido mediante un procedimiento según la reivindicación 12.