

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 499 032**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/03 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2009 E 09799319 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014 EP 2367938**

54 Título: **Grupo genético de cepas de Streptococcus thermophilus que tiene propiedades reológicas únicas para fermentación láctica**

30 Prioridad:

12.12.2008 EP 08305935

12.12.2008 US 121959 P

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

26.09.2014

73 Titular/es:

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

**Langebrogade 1, Postboks 17
1001 Copenhagen K, DK**

72 Inventor/es:

**MANOURY, ELISE;
HORVATH, PHILIPPE;
FREMAUX, CHRISTOPHE y
FOURCASSIE, PASCAL**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 499 032 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

Grupo genético de cepas de *Streptococcus thermophilus* que tiene propiedades reológicas únicas para fermentación láctica

Sector de la técnica

La invención se refiere a un grupo genético de cepas de *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) que tiene propiedades reológicas únicas para fermentación láctica.

Estado de la técnica

Las cepas de *S. thermophilus* se usan ampliamente en solitario o en combinación de otras cepas de *S. thermophilus* o en combinación de otros microorganismos para la producción de productos alimenticios fermentados. Por ejemplo, se incluyen en la formulación de cultivos iniciadores utilizados para la producción de yogur. Se espera que las cepas de *S. thermophilus* participen en la formación de cuajada láctica por acidificación de la leche en el desarrollo de la textura del producto fermentado. Por tanto, las cepas de *S. thermophilus* se caracterizan generalmente por sus propiedades funcionales, es decir, por sus propiedades acidificantes y texturizantes. Una cepa texturizante es una cepa que permite obtener leches fermentadas que pueden describirse por sus propiedades reológicas, tales como viscosidad y fibrosidad. Las cepas de *S. thermophilus* texturizantes conocidas hasta ahora pueden clasificarse en tres grupos basándose en estas propiedades reológicas: 1) alta viscosidad y alta fibrosidad, 2) baja viscosidad y baja fibrosidad y 3) viscosidad y fibrosidad media. Sin embargo, sería interesante tener una cepa de *S. thermophilus* que tuviese propiedades reológicas que permitiesen obtener leches fermentadas que tuviesen una alta viscosidad y una baja fibrosidad.

Por tanto uno de los problemas que la invención propone resolver es proporcionar nuevas cepas de *S. thermophilus* que produzcan leches fermentadas que tengan una alta viscosidad y una baja fibrosidad.

Objeto de la invención

Durante su investigación, los autores de la invención han encontrado un nuevo grupo genético de cepas de *S. thermophilus* que tiene propiedades reológicas únicas para fermentación láctica: la leche fermentada con las cepas de la invención es muy viscosa y poco fibrosa. Los autores de la invención también descubrieron que, además de estas propiedades reológicas únicas, el genoma de estas cepas comprende sorprendentemente un locus CRISPR que tiene la secuencia de SEC ID N° 1 que hasta ahora se desconocía.

Las CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas Regularmente Espaciadas) son locus altamente polimórficos que se sabe que confieren resistencia a fagos (Barrangou et al., Science. 23 de marzo de 2007; 315(5819):1709-12; Horvath et al., J Bacteriol. Febrero de 2008; 190(4):1401-12; Deveau et al., J Bacteriol. Febrero de 2008; 190(4):1390-400). Los locus CRISPR están compuestos por repeticiones de ADN conservadas, cortas, que están separadas por secuencias únicas de tamaño similar denominadas espaciadores. Es el contenido del espaciador, en cuanto a la disposición del espaciador y secuencias de nucleótidos del espaciador, lo que es específico para cualquier familia de cepas determinada (Horvath et al., J Bacteriol. Febrero 2008; 190(4):1401-12). Dependiendo de la cepa, en el genoma de *S. thermophilus*, puede haber simultáneamente hasta tres locus CRISPR. Se ha sugerido que los locus CRISPR son las regiones más rápidamente evolucionadas en el genoma de *S. thermophilus*, y por tanto son dianas muy relevantes a tener en cuenta en la diferenciación e identificación de las cepas (Bolotin et al. Microbiology. Agosto de 2005; 151(Pt 8):2551-61; Horvath et al. J Bacteriol. Febrero de 2008; 190(4): 1401-12).

Por consiguiente, gracias a esta nueva secuencia CRISPR, la cepa de *S. thermophilus* de la invención puede identificarse fácilmente: las cepas de *S. thermophilus* que tienen la misma secuencia CRISPR en su genoma pueden identificarse como miembros de la misma familia de cepas, compartiendo de este modo las mismas propiedades técnicas, es decir, las propiedades reológicas únicas como se ha descrito anteriormente.

Por tanto la invención se refiere, en un primer aspecto, a cepas de *S. thermophilus*, en las que la leche fermentada con dichas cepas tiene una viscosidad mayor de aproximadamente 55 Pa.s cuando se mide con el Ensayo A y un Tiempo de Rotura Relativo de Caber menor de aproximadamente 0,015 segundos cuando se mide con el Ensayo B.

En otro aspecto, la invención también se refiere a un grupo genético de cepas de *S. thermophilus*, en el que el genoma de dichas cepas comprende un locus CRISPR que tiene la secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 1.

La invención se refiere no obstante a un grupo genético de cepas de *S. thermophilus*, en que el genoma de dichas cepas comprende un locus CRISPR que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en 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, SEC ID N°9, SEC ID N°10, SEC ID N°11 y SEC ID N° 12.

Otro aspecto de la invención es la cepa de *S. thermophilus* depositada según el Tratado de Budapest el 7 de Octubre de 2008 en nombre de Danisco Deutschland GmbH en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número DSM 21892.

5 La invención también se refiere a una composición bacteriana que comprende una cepa de acuerdo con la invención.

Otro objeto aún de la invención es un método para preparar productos lácteos fermentados, en el que dicho método comprende fermentar un sustrato lácteo con una cepa de *S. thermophilus* de acuerdo con la invención o con la
10 composición bacteriana como se ha definido anteriormente.

La invención también se refiere a un producto lácteo que puede obtenerse mediante el método como se ha definido anteriormente.

15 La invención se refiere también al uso de una cepa de acuerdo con la invención o de la composición bacteriana de acuerdo con la invención para preparar productos lácteos fermentados. Un objeto de la invención es también un producto lácteo que comprende una cepa de acuerdo con la invención o la composición bacteriana como se ha definido anteriormente.

20 Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a cepas de *S. thermophilus*, en el que la leche fermentada con dichas cepas es muy viscosa y poco fibrosa. Típicamente, la leche fermentada con una cepa de la invención tiene una viscosidad mayor de aproximadamente 55 Pa.s cuando se mide con el Ensayo A y un Tiempo de Rotura Relativo de Caber menor de aproximadamente 0,015 segundos cuando se mide con el Ensayo B.
25

Típicamente, la viscosidad anteriormente mencionada de la leche fermentada con una cepa de acuerdo con la invención es mayor de aproximadamente 56, 57, 58, 59, 60 o 61 Pa.s. Además, dicha viscosidad es típicamente menor de 80 Pa.s. En particular, la viscosidad es menor de 75, 70 o 65 Pa.s.
30

Aun típicamente, la leche fermentada mencionada anteriormente con una cepa de la invención tiene un Tiempo de Rotura Relativo de Caber de 0 a 0,015 segundos cuando se mide con el Ensayo B. En particular dicho Tiempo de Rotura Relativo de Caber es menor de aproximadamente 0,014, 0,013, 0,012, 0,011 o 0,010 segundos.

35 Dentro del ámbito de la invención, se incluye cualquier combinación de los valores anteriores de viscosidad y de Tiempo de Rotura Relativo de Caber.

De acuerdo con la invención, la viscosidad de la leche fermentada con la cepa de la invención se mide mediante el Ensayo A. Este ensayo se describe ampliamente en la sección experimental. En resumen, la medición de la viscosidad de acuerdo con el Ensayo A comprende las siguientes etapas:
40

1) obtener una leche fermentada con una cepa de *S. thermophilus*:

- calentando a 90 °C durante 10 minutos leche UHT semidesnatada comercial (1,5 % p/p de grasa) complementada con leche en polvo descremada al 3%,
45
- añadiendo 1g/100 l (p/v) de formiato sódico justo antes de la inoculación,
- inoculando la leche con $1 \cdot 10^6$ ufc/ml de leche de una cepa de *S. thermophilus* conservada a -80 °C en un medio basado en leche,
- incubando la leche inoculada a una temperatura constante de 43 °C +/- 1 °C en un baño de agua hasta que el pH alcance un valor de 4,60 +/- 0,1, midiéndose el pH con un sistema Cinac,
50
- enfriando la leche fermentada a 6 °C, y después
- conservando la leche fermentada a 6 °C durante 14 días,

2) medir, a una temperatura de 8 °C +/- 2 °C, la viscosidad de la leche fermentada obtenida de acuerdo con la etapa 1:
55

- instalando un viscosímetro Brookfield (Brookfield Engineering laboratories, Inc.) sobre un soporte Helipath,
- proporcionando a dicho viscosímetro un eje de barra en T de tipo C,
- llenando un tarro de yogur de vidrio de 125 ml con la leche fermentada,
60
- introduciendo en el viscosímetro el tarro de yogur lleno con la leche fermentada,
- aplicando al viscosímetro una velocidad de 10 rpm, y después
- leyendo, tras 30 segundos de rotación, la viscosidad de la muestra.

Un sistema Cinac de acuerdo con la invención se describe, por ejemplo, en la siguiente referencia: CINAC, un sistema automatizado para el control de iniciadores lácticos; Corrieu-G, Picque-D, Perret-B, Quemener-P; Process Magazine; 1992; no. 1068; págs. 24-27.
65

Dentro del significado de la invención, el Tiempo de Rotura Relativo es el tiempo necesario para que un filamento fluido vaya, a una temperatura de 20 °C, de un diámetro de 55 µm hasta que se rompe con una desviación típica de +/- 8% cuando se mide con un Reómetro Extensional de Rotura Capilar. De acuerdo con la invención, el Tiempo de Rotura Relativo de Caber de la leche fermentada se mide mediante el Ensayo B. Este ensayo se describe completamente en la sección experimental. En resumen, la medición de la viscosidad de acuerdo con el Ensayo B comprende las siguientes etapas:

- 1) obtener una leche fermentada con una cepa de *S. thermophilus* como se describe en la etapa 1) del Ensayo A,
- 2) medir el Tiempo de Rotura Relativo de Caber de la leche fermentada con la cepa de *S. thermophilus*:

- calentando a 20 °C una muestra de la leche fermentada obtenida en la etapa 1),
- degradando y homogeneizando el gel agitando 20 veces con una cuchara de plástico convencional,
- colocando 60 µl de la leche fermentada homogeneizada entre dos placas de un Reómetro Extensional de Rotura Capilar (CaBER 1 de HAAKE, THERMO ELECTRON Corp.), que tenga la siguiente configuración:

- diámetro de placa: 6mm
- altura inicial: 2 mm
- altura final: 9,65 mm
- velocidad de golpe: 0,24 mm/ms (Tiempo de golpe: 40 ms)
- micrómetro laser: laser de clase 1 que actúa en el infrarrojo y que tiene una resolución de 10 µm,

y después

- midiendo el Tiempo de Rotura Relativo de la muestra.

En otro aspecto, la invención también se refiere, a un grupo genético de cepas de *S. thermophilus*, en el que el genoma de dichas cepas comprende un locus CRISPR que tiene la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°1.

A continuación se muestra la secuencia SEC ID N°1 del locus CRISPR (líder para orientación remolque, Horvath et al., J Bacteriol. Febrero de 2008; 190(4):1401-12) de las cepas de *S. thermophilus* de la invención, mostrando las repeticiones en letras mayúsculas y los espaciadores en letras minúsculas:

```

5'-GTTTTTGTACTCTCAAGATTTAAGTAACTGTACAACtaaattattaatatcatcccatcgatctg
GTTTTTGTACTCTCAAGATTTAAGTAACTGTACAACggataaggcgagacaagaacaacttaagca
GTTTTTGTACTCTCAAGATTTAAGTAACTGTACAACgcgaccatgtaacgccgtagaaatagcg
GTTTTTGTACTCTCAAGATTTAAGTAACTGTACAACcaaggaggatcgaaccctgacagccaacaa

GTTTTTGTACTCTCAAGATTTAAGTAACTGTACAACcgctatgaatgctgtattaaaagcttttaa
GTTTTTGTACTCTCAAGATTTAAGTAACTGTACAACgacttagggcgctacccttaaaaatagca
GTTTTTGTACTCTCAAGATTTAAGTAACTGTACAACcctatataaaaagaagacagaatattcta
GTTTTTGTACTCTCAAGATTTAAGTAACTGTACAACaacaatggctaagaaattcagccctaacgc
GTTTTTGTACTCTCAAGATTTAAGTAACTGTACAACacggttcctaatgcatgaaaatcgaaacg
GTTTTTGTACTCTCAAGATTTAAGTAACTGTACAACcccctacgaaatttaaacgacccccccgcg
GTTTTTGTACTCTCAAGATTTAAGTAACTGTACAACtacctaccatggaacgattactatgcagc
GTTTTTGTACTCTCAAGATTTAAGTAACTGTACAATgggaagttataattacgaaaaggtagatat
GTTTTTGTACTCTCAAGATTTAAGTAACTGTACAACtatgtcaccacgttgcaaccctacaccact
GTTTTTGTACTCTCAAGATTTAAGTAACTGTACAAT-3'

```

La SEC ID N° 1 contiene 14 repeticiones que son casi idénticas; únicamente la duodécima y decimocuarta repetición tiene una base diferente en su extremo 3' (T en lugar de C). Estas repeticiones definen 13 espaciadores, todos únicos y diferentes a partir de las 971 secuencias espaciadoras CRISPR de *S. thermophilus* no redundantes que están presentes en el GenBank (números de acceso CP000023, CP000024, CP000419, DQ072985 a DQ073008, y EF434458 a EF434504) o descritas en Horvath et al. (J Bacteriol. Febrero 2008; 190(4):1401-12). Esta observación indica que las cepas de *S. thermophilus* de la invención poseen características genéticas únicas que pueden aprovecharse para identificar y rastrear sin ambigüedad estas cepas tecnológicamente únicas.

La invención también concierne a un grupo genético de cepas de *S. thermophilus*, en el que el genoma de dichas cepas comprende un locus CRISPR que tiene la secuencia de nucleótidos de un derivado de SEC ID N° 1.

5 De acuerdo con la invención, un derivado de SEC ID N° 1 es una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos 90% con la SEC ID N° 1, particularmente una identidad de al menos 95% con la SEC ID N° 1; más particularmente una identidad de al menos 98% con la SEC ID N° 1 y más particularmente una identidad de al menos 99% con la SEC ID N° 1.

10 Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean para establecer una comparación óptima. Por ejemplo, pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de ácido nucleico para alineamiento óptimo con la segunda secuencia de ácido nucleico. Después se comparan los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando en la primera secuencia una posición está ocupada por el mismo nucleótido que en la posición correspondiente en la segunda secuencia, los
15 ácidos nucleicos son idénticos en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias depende del número de nucleótidos idénticos compartidos por las secuencias.

Por tanto, % de identidad= [número de nucleótidos idénticos/número total de posiciones solapantes] X 100. El porcentaje de identidad de secuencia se calcula por tanto de acuerdo con esta fórmula, comparando dos secuencias
20 óptimamente alineadas sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que se producen las bases de ácidos nucleicos idénticas (por ejemplo, A, T, C, G) en ambas secuencias para dar lugar al número de posiciones coincidentes (el "número de posiciones idénticas" en la fórmula anterior), dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (por ejemplo, el tamaño de ventana) (el "número total de posiciones solapantes" en la fórmula anterior), y multiplicando el resultado
25 por 100 para dar lugar al porcentaje de identidad de secuencia.

En esta comparación, las secuencias pueden tener la misma longitud o pueden tener longitud diferente. El alineamiento óptimo de secuencias para determinar una ventana de comparación puede realizarse mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (1972), buscando la similitud mediante el método de Pearson y Lipman (1988), mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete Informático Wisconsin Genetics Edición 7.0, Genetic Computer Group, 575, Science Drive, Madison, Wisconsin), o por inspección.

30 Típicamente, un derivado que tiene una identidad de al menos 90% con la SEC ID NO: comprende por ejemplo un número promedio de 3 mutaciones por espaciador y repetición, es decir 81 mutaciones. El experto en la técnica entenderá fácilmente que un "número promedio de 3 mutaciones por espaciador y repetición" significa que una o más repeticiones o espaciadores pueden comprender más de 3 mutaciones, por ejemplo, 4, 5, 6, 7 o más, mientras que otros espaciadores o repeticiones pueden comprender menos de 3 mutaciones, por ejemplo 2, 1 o 0 mutaciones.
40

El porcentaje de identidad se calcula por tanto de la siguiente manera:

45 número de posiciones idénticas: 895-81=814
número total de posiciones solapantes: 895
porcentaje de identidad: $(814/895)*100=90,9\%$

Típicamente, un derivado que tiene una identidad de al menos 95% con la SEC ID NO: comprende por ejemplo un número promedio de 3 mutaciones por espaciador, es decir 39 mutaciones. El experto en la técnica entenderá fácilmente que un "número promedio de 3 mutaciones por espaciador" significa que uno o más espaciadores pueden comprender más de 3 mutaciones, por ejemplo 4, 5, 6, 7 o más, mientras que otros espaciadores pueden comprender menos de 3 mutaciones, por ejemplo 2, 1 o 0 mutaciones. El porcentaje de identidad se calcula por tanto de la siguiente manera:

55 número de posiciones idénticas: 895-39=856
número total de posiciones solapantes: 895
porcentaje de identidad: $(856/895)*100=95,6\%$.

Típicamente, un derivado que tiene una identidad de al menos 98% con la SEC ID NO: comprende por ejemplo un número promedio de 1 mutación por espaciador, es decir 13 mutaciones. El experto en la técnica entenderá fácilmente que un "número promedio de 1 mutación por espaciador" significa que uno o más espaciadores pueden comprender más de 1 mutación, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más, mientras que otros espaciadores pueden no comprender ninguna mutación.

65 El porcentaje de identidad se calcula por tanto de la siguiente manera:

número de posiciones idénticas: 895-13=882
 número total de posiciones solapantes: 895
 porcentaje de identidad: $(882/895)*100=98,5\%$.

5 Típicamente, un derivado que tiene una identidad de al menos 99% con la SEC ID NO: comprende, por ejemplo, una mutación en su secuencia, particularmente en un espaciador. El porcentaje de identidad se calcula por tanto de la siguiente manera:

10 número de posiciones idénticas: 895-1=894
 número total de posiciones solapantes: 895
 porcentaje de identidad: $(894/895)*100=99,8\%$.

15 Como se usa en este documento "mutación" significa delección, sustitución o inserción de un nucleótido de una secuencia de nucleótidos.

Por consiguiente, una cepa de *S. thermophilus*, cuyo genoma comprende una secuencia CRISPR correspondiente a una secuencia derivada de la SEC ID N°1 como se define previamente, tendrá las propiedades reológicas de acuerdo con la invención.

20 Además, dado que los 13 espaciadores de la SEC ID N° 1 son todos únicos y diferentes a los de las otras secuencias espaciadoras CRISPR de *S. thermophilus* conocidas hasta ahora, la detección de al menos tres espaciadores sucesivos mencionados anteriormente separados por las repeticiones mencionadas anteriormente en el genoma de una cepa de *S. thermophilus* es suficiente para identificar una cepa de *S. thermophilus* de acuerdo con la invención, es decir que tiene las propiedades reológicas previamente mencionadas. La detección de al menos tres espaciadores/repeticiones no es arbitraria. De hecho, el conocimiento actual sobre la forma de evolucionar las secuencias CRISPR indica que la probabilidad de tener una cepa de *S. thermophilus* (no relacionada con la cepa de acuerdo con la invención) que contenga uno de estos espaciadores es significativa; siendo poco frecuente que contenga dos de estos espaciadores consecutivos y siendo muy baja que contenga tres de estos espaciadores consecutivos.

30 La invención por tanto también se refiere a un grupo genético de cepas de *S. thermophilus*, en el que el genoma de dichas cepas comprende un locus CRISPR que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en 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, SEC ID N°9, SEC ID N°10, SEC ID N°11 y SEC ID N°12.

35 Estas secuencias, de SEC ID N° 2 a 12, corresponden a 3 espaciadores consecutivos separados por 2 repeticiones del locus CRISPR.

40 La invención también concierne a un grupo genético de cepas de *S. thermophilus*, en el que el genoma de dichas cepas comprende un locus CRISPR que comprende un derivado de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en 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, SEC ID N°9, SEC ID N°10, SEC ID N°11 y SEC ID N°12.

45 De acuerdo con la invención, un derivado de 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, SEC ID N°9, SEC ID N°10, SEC ID N°11 y SEC ID N°12 es una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos 90%, particularmente una identidad de al menos 94%, más particularmente una identidad de al menos 96%, más particularmente una identidad de al menos 99% con la 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, SEC ID N°9, SEC ID N°10, SEC ID N°11 o SEC ID N°12 respectivamente.

50 El porcentaje de identidad se calcula como se describió anteriormente.

Típicamente, un derivado que tiene una identidad de al menos 90% con una de las SEC ID N°2 a SEC ID N°12 comprende, por ejemplo, un número promedio de 3 mutaciones por espaciador y repetición, es decir 15 mutaciones. El experto en la técnica entenderá fácilmente que un "número promedio de 3 mutaciones por espaciador y repetición" significa que una o más repeticiones o espaciadores pueden comprender más de 3 mutaciones, por ejemplo, 4, 5, 6, 7 o más, mientras que otros espaciadores o repeticiones pueden comprender menos de 3 mutaciones, por ejemplo, 2, 1 o 0 mutaciones.

60 El porcentaje de identidad se calcula por tanto de la siguiente manera:

número de posiciones idénticas: 163-15=148
 número total de posiciones solapantes:163
 porcentaje de identidad: $(148/163)*100=90,8\%$.

65

Típicamente, un derivado que tiene una identidad de al menos 94% con una de las SEC ID N°2 a SEC ID N°12 comprende, por ejemplo, un número promedio de 3 mutaciones por espaciador, es decir 9 mutaciones. El experto en la técnica entenderá fácilmente que un "número promedio de 3 mutaciones por espaciador" significa que uno o más espaciadores pueden comprender más de 3 mutaciones, por ejemplo, 4, 5, 6, 7 o más, mientras que otros espaciadores pueden comprender menos de 3 mutaciones, por ejemplo, 2, 1 o 0 mutaciones.

El porcentaje de identidad se calcula por tanto de la siguiente manera:

número de posiciones idénticas: $163-9=154$
 número total de posiciones solapantes:163
 porcentaje de identidad: $(154/163)*100=94,4\%$.

Típicamente, un derivado que tiene una identidad de al menos 96% con una de las SEC ID N°2 a SEC ID N°12 comprende, por ejemplo, un número promedio de 1 mutación por espaciador y repetición, es decir 5 mutaciones. El experto en la técnica entenderá fácilmente que un "número promedio de 1 mutación por espaciador y repetición" significa que una o más repeticiones o espaciadores pueden comprender más de 1 mutación, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, mientras que otros espaciadores o repeticiones pueden no comprender ninguna mutación.

El porcentaje de identidad se calcula por tanto de la siguiente manera:

número de posiciones idénticas: $163-5=158$
 número total de posiciones solapantes:163
 porcentaje de identidad: $(158/163)*100=96,9\%$.

Típicamente, un derivado que tiene una identidad de al menos 99% con una de las SEC ID N°2 a SEC ID N°12 comprende, por ejemplo, una mutación en su secuencia, particularmente en un espaciador. El porcentaje de identidad se calcula por tanto de la siguiente manera:

número de posiciones idénticas: $163-1=162$
 número total de posiciones solapantes:163
 porcentaje de identidad: $(162/163)*100=99,3\%$.

Por consiguiente, una cepa de *S. thermophilus*, cuyo genoma comprende una secuencia CRISPR correspondiente a una secuencia derivada de una cualquiera de las SEC ID N° 1 a 12 como se define previamente, tendrá las propiedades reológicas de acuerdo con la invención.

La presencia de la SEC ID N° 1 a SEC ID N° 12 o de un derivado de las mismas en el genoma de cepas de *S. thermophilus* puede detectarse fácilmente mediante cualquier método conocido por el experto en la técnica.

Por ejemplo, el experto en la técnica puede realizar fácilmente una PCR con cebadores seleccionados en las secuencias espaciadoras, o una hibridación de ADN-ADN con sondas correspondientes a los espaciadores, o secuenciar uno o varios locus CRISPR en el genoma de la cepa. Por lo tanto, la invención también se refiere a un método para predecir un miembro de la cepa de una familia de cepas cuyo genoma comprenda la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 1 a SEC ID N° 12 o un derivado de las mismas.

Típicamente, las cepas que pertenecen al grupo genético de cepas de *S. thermophilus* definido anteriormente tienen propiedades reológicas únicas. Dentro del significado de la invención, propiedades reológicas únicas, significa una cepa que produce leche fermentada que tiene una viscosidad mayor de aproximadamente 55 Pa.s cuando se miden con el Ensayo A y un Tiempo de Rotura Relativo de CaBER menor de aproximadamente 0,05 segundos cuando se mide con el Ensayo B; siendo los Ensayos A y B como se ha definido anteriormente.

Típicamente, una cepa de acuerdo con la invención es la cepa de *S. thermophilus* depositada según el Tratado de Budapest el 7 de octubre de 2008 en nombre de Danisco Deutschland GmbH en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, localizado en Inhoffenstr. 7 B, D-38124 Braunschweig, Alemania, con el número DSM 21892 o un mutante de la misma que conserva las mismas propiedades reológicas.

Para obtener dichas cepas mutantes, un experto en la técnica puede utilizar las técnicas de mutagénesis habituales tales como radiación UV o exposición a productos químicos mutagénicos (etil-metano-sulfonato, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, ácido nitroso, análogos de bases de nucleótidos tales como bromouracilo, y acridinas etc.), pero se contempla la idoneidad de cualquier otro mutágeno que sea eficaz.

En una realización, las cepas mutantes son insensibles a fagos. El espectro de sensibilidad de una cepa contra los bacteriófagos, también denominado lisotipo, está constituido por todas las sensibilidades y resistencias a dichos bacteriófagos. Por ejemplo, un método para determinar el lisotipo de una cepa de *S. thermophilus*, y por lo tanto su sensibilidad contra infección por fagos, se describe por completo en el documento WO2008040734. De acuerdo con técnicas de mutagénesis convencionales, la mutagénesis se realiza después de una selección adecuada de las

cepas que tienen las propiedades reológicas únicas de las cepas de la invención, que pueden medirse mediante los Ensayos A y B como se ha definido anteriormente.

5 Un objeto particular de la invención es la cepa de *S. thermophilus* depositada según el Tratado de Budapest el 7 de octubre de 2008 en nombre de Danisco Deutschland GmbH en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número DSM 21892.

10 La invención también se refiere a una composición bacteriana que comprende una cepa de acuerdo con la invención. Una composición bacteriana significa una mezcla de diferentes cepas, en particular un cultivo iniciador o un fermento.

15 Las mezclas de cepas preferidas de acuerdo con la invención son mezclas de *S. thermophilus* con otras *S. thermophilus*, o mezclas de *S. thermophilus* con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, o mezclas de *S. thermophilus* con otras *Lactobacillus* y/o con *Bifidobacterium*, o mezclas de *S. thermophilus* con *Lactococcus*, o mezclas de *S. thermophilus* con otras cepas de bacterias y/o levaduras lácticas.

20 Otro objeto de la invención es un método para preparar productos lácteos fermentados, en el que dicho método comprende fermentar un sustrato lácteo con una cepa de *S. thermophilus* de acuerdo con la invención o con la composición bacteriana como se ha definido anteriormente.

25 Típicamente, el sustrato lácteo es leche natural o reconstituida, descremada u otra, o medios basados en leche o medios basado en productos de origen lácteo. Este sustrato lácteo puede comprender componentes normalmente utilizados para la preparación de postres lácteos. Típicamente dichos componentes normalmente utilizados para la preparación de postres lácteos son componentes sólidos, tales como, por ejemplo, frutas, trocitos de chocolate o cereales, pero también productos edulcorados o chocolates líquidos.

La invención también se refiere a un producto lácteo que puede obtenerse mediante el método como se ha definido anteriormente.

30 La invención aún se refiere al uso de una cepa de acuerdo con la invención o a la composición bacteriana de acuerdo con la invención para preparar productos lácteos fermentados.

35 Un objeto de la invención es también un producto lácteo que comprende una cepa de acuerdo con la invención o la composición bacteriana como se ha definido anteriormente.

40 Dentro del significado de la invención, por "producto lácteo" se entiende leche fermentada, un yogur, una crema madurada, un queso, un queso fresco, una bebida láctea, un concentrado de un producto lácteo, un queso fundido, un postre de crema, un requesón, o una leche para lactantes. Aun típicamente, el producto lácteo de acuerdo con la invención, comprende leche de origen animal y/o vegetal.

La presente invención se ilustra mejor a continuación utilizando los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se ofrecen tan solo a modo ilustrativo de la materia objeto de la invención y de ninguna manera constituyen una limitación.

45 Descripción de las figuras

FIG.1: Relación entre el nivel del atributo sensorial "fibrosidad" y el Tiempo de Rotura Relativo (TRR) medido con el reómetro CaBER 1 en seis leches fermentadas.

FIG.2: Características reológicas, viscosidad y Tiempo de Rotura Relativo, de 14 leches fermentadas con 14 cepas diferentes de cepas de *S. thermophilus*.

50 EJEMPLO: EVALUACIÓN DE FIBROSIDAD Y VISCOSIDAD DE LECHEs FRESCAS FERMENTADAS

Preparación de leches frescas fermentadas

55 Se prepararon leches fermentadas de acuerdo con las siguientes condiciones experimentales:

Preparación de base láctea:

60 Durante 10 minutos, se trató leche UHT semidesnatada comercial (1,5% p/p de grasa) + leche en polvo descremada al 3% con calor a 90 °C. Justo antes de la inoculación se añadió 1 g/100 l (p/v) de formiato sódico.

Inoculación:

65 La inoculación se realizó con la cepa conservada a -80 °C en un medio basado en leche. La tasa de inoculación fue 1.10⁶ ufc/ml de base láctea.

Fermentación:

La temperatura de incubación se estableció a 43 °C +/- 1 °C, y se mantuvo constante en un baño de agua durante la fermentación. Se utilizó un sistema Cinac (CINAC, un sistema automatizado para el control de iniciadores lácticos; Corrieu-G, Picque-D, Perret-B, Quemener-P; Process Magazine; 1992; número 1068; págs. 24-27) para la medición en-línea del cambio de pH. A un pH de 4,60 +/- 0,1, el producto fermentado se enfrió a 6 °C y después se conservó a 6 °C durante 14 días.

Para la evaluación de la fibrosidad, se realizaron dos técnicas diferentes. La primera de ellas se basó en una medición de reología extensional y la segunda se basó en una evaluación sensorial.

Descripción y principio del reómetro extensional CaBER 1 para para evaluar las propiedades extensionales de leches frescas fermentadas

El concepto de reometría extensional es análogo al de reometría en cizalla. Pero en lugar de obtener la viscosidad de cizalla aplicando una fuerza conocida en cizalla y medir el desplazamiento resultante, se realiza un procedimiento similar en extensión. Se aplica fuerza unidireccionalmente. Este principio permite medir el componente de elasticidad de la textura de un producto determinado.

El Reómetro Extensional de Rotura Capilar (*Capillary Break-up Extensional Rheometer* (aparato CaBER 1 de HAAKE, THERMO ELECTRON Corporation) es un aparato diseñado para evaluar la viscosidad extensional de un producto que ha sido desarrollado por el Grupo Cambridge Polymer (G.H. Mckinley et al. J. Rheo. 2000 44(3): 653-70; S.L. Anna et al. J. Rheo. 2001 45(1): 115-38).

Para medir la viscosidad extensional, se colocaron 60 µl de leche fresca fermentada entre dos placas circulares paralelas. El producto se sometió a una extensión rápida moviendo la placa superior hacia arriba, formando un filamento fluido. Después, un micrómetro laser mide el diámetro de la reducción del filamento.

El diámetro del punto medio del filamento de fluido gradualmente reducido comienza a medirse después de que la placa superior haya alcanzado su posición final. El aparato registra la reducción del filamento fluido (1000 mediciones por segundo). La evolución del diámetro del filamento a lo largo del tiempo puede representarse. Esto permite determinar el diámetro inicial del filamento y su tiempo de rotura.

Los autores de la invención desarrollaron un protocolo específico para evaluar el valor del tiempo de rotura de leches frescas fermentadas. La leche fresca fermentada se preparó como se ha descrito anteriormente. La muestra se calienta a 20 °C. El gel se rompe y se homogeneiza agitando (20 agitaciones) utilizando una cuchara de plástico convencional. Una alícuota de la muestra se extrae utilizando una Multipipeta Plus (Eppendorf) y combitips de 0,5 ml (Eppendorf). Entre las dos placas del CaBER se colocan 60 µl. Se utilizó el siguiente ajuste del CaBER:

Diámetro de placa: 6 mm
 Altura Inicial: 2 mm
 Altura Final: 9,65 mm
 Velocidad de Golpe: 0,24 mm/ms (Tiempo de Golpe: 40 ms).

Para cada muestra se realizaron 4 mediciones. Los datos utilizados para calificar la viscosidad extensional de la muestra es el Tiempo de Rotura Relativo (TRR). El TRR es el tiempo necesario para que un filamento fluido vaya de un diámetro de 55 µm hasta que se rompe. Se ha calculado que la desviación típica del método es de +/- 8%.

Evaluación de la fibrosidad por degustación sensorialFormación sobre el descriptor "fibrosidad"

Las sesiones de degustación sensorial requieren 3 evaluadores especialistas. A estos evaluadores se les solicita que evalúen los productos en condiciones ocultas (las leches fermentadas se codifican) sobre un descriptor de textura específico: "fibrosidad". La "fibrosidad" se evaluó de la siguiente manera: con una cuchara de leche fermentada inclinada algunos centímetros por encima de la taza, se evaluó la capacidad del producto para fluir de manera continua y formar una fibra intacta.

Las leches fermentadas se clasificaron de 0 para una leche fermentada "no fibrosa" (sin fibra) a 4 para cada leche fermentada "fibrosa" (larga fibra intacta). Después, los 3 evaluadores llegaron a una clasificación consensuada. Esta clasificación consensuada quedó registrada.

Para formar a los evaluadores especialistas en la evaluación del descriptor "fibrosidad", se prepararon 3 leches fermentadas utilizando 3 cepas de referencia:

- Clasificación 0: fibrosidad de una leche fermentada preparada con la cepa CNCM 1-2429
- Clasificación 2: fibrosidad de una leche fermentada preparada con la cepa CNCM 1-2433
- Clasificación 4: fibrosidad de una leche fermentada preparada con la cepa CNCM 1-2980

5 Ensayo de leches frescas fermentadas

Se produjeron 6 leches frescas fermentadas de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. Se obtuvieron leches frescas fermentadas inoculando con seis únicas cepas, respectivamente: DSM 21892, CNCM 1-3617, DSM 18344, CNCM 1-2429, CNCM 1-2423 y CNCM I-2980.

10 Las cepas CNCM 1-2429, CNCM I-2423, CNCM I-2980 y CNCM I-3617 se mencionaron, por ejemplo, en la solicitud de patente publicada WO08/040734 presentada por Danisco A/S el 10-02-2007. La cepa DSM 18344 se mencionó, por ejemplo, en el documento WO07/144770 presentado por Danisco A/S el 06-08-2007.

15 Como era de esperar, la fibrosidad de la leche fermentada obtenida con la cepa CNCM I-2429 se evaluó con una clasificación 0. De manera similar, se evaluaron leches fermentadas obtenidas con las cepas CNCM 1-2423 y CNCM I-2980 con una clasificación 2 y clasificación 4 (véase figura 1), respectivamente; validando de esta manera los datos obtenidos para las otras leches fermentadas. La leche fermentada preparada con la cepa DSM 21892 obtuvo una clasificación consensuada de 0 en la evaluación de fibrosidad. La clasificación consensuada para la evaluación de fibrosidad fue de 1 y 3 para las leches fermentadas preparadas con las cepas CNCM 1-3617 y DSM 18344, respectivamente (véase la figura 1).

El nivel de fibrosidad sensorial está relacionado con el valor TRR

25 Los valores TRR también se midieron con el CaBER 1 para las seis leches fermentadas ensayadas. En general, los aumentos en la fibrosidad sensorial se correlacionan con los aumentos en el Tiempo de Rotura Relativo de Caber (figura 1). Este resultado indica que los dos parámetros están muy relacionados. La leche fermentada preparada con la cepa DSM 21892 tuvo un valor bajo para el Tiempo de Rotura Relativo, al igual que la leche fermentada con la cepa CNCM 1-2429 (es decir <0,015s). La cepa de referencia CNCM I-2980 muy fibrosa tuvo un nivel alto para este parámetro (0,118s).

La leche fermentada con la cepa DSM 21892 presenta características reológicas únicas que pueden calificarse como muy espesa y poco fibrosa

35 Para evaluar la viscosidad se utilizó un viscosímetro Brookfield (Brookfield Engineering laboratories, Inc.). El aparato se instaló sobre un soporte Helipath (Brookfield Engineering laboratories, Inc.). El viscosímetro se equipó con un eje de barra en T de tipo C y la velocidad aplicada fue de 10 rpm. La viscosidad se midió a una temperatura de 8 °C +/- 2 °C y se leyó después de 30 segundos de rotación. Generalmente se reconoce que el nivel de viscosidad está directamente relacionado con el nivel del atributo espesor evaluado por sesión de degustación sensorial (véase la patente WO 2004/085607 A2).

La figura 2 muestra el posicionamiento relativo de 14 leches frescas fermentadas, producidas con 14 cepas diferentes de *S. thermophilus*, para la respuesta al Tiempo de Rotura Relativo (TRR) y viscosidad.

45 Las cepas CNCM 1-2429, CNCM 1-2423, CNCM I-2980, CNCM I-3617 se mencionaron por ejemplo en la solicitud de patente publicada WO08/04073 presentada por Danisco A/S el 10-02-2007.

50 Como una tendencia general, la viscosidad de la leche fresca fermentada aumenta linealmente con el valor TRR, excepto para la cepa DSM 21892 que conserva un valor TRR bajo aunque la viscosidad se eleva significativamente, más de 55 Pa.s.

Conclusión

55 La combinación de estas propiedades reológicas únicas, es decir, baja fibrosidad y alta viscosidad, hasta ahora nunca contemplada, confiere a las cepas de acuerdo con la invención aplicaciones muy prometedoras, en particular para el desarrollo de nuevos productos lácteos con texturas únicas y nuevas aun nunca propuestas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DANISCO A/S

5 <120> GRUPO GENÉTICO DE CEPAS DE *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* QUE TIENE PROPIEDADES REOLÓGICAS ÚNICAS PARA FERMENTACIÓN LÁCTICA

<130> BET080320

10 <160> 12

<170> PatentIn versión 3,3

15 <210> 1

<211> 895

<212> ADN

<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 1

```

gttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaactaaa tttattaata tcatcccatc      60
gatctggttt ttgtactctc aagatttaag taactgtaca acggataagg cgagacaaga      120
acaacttaag cagtttttgt actctcaaga ttttaagtaac tgtacaacgc gaccatgtaa      180
cgccggtaga aatagcgggt tttgtactct caagatttaa gtaactgtac aaccaaggga      240
gtcgaacccc tgacagccaa caagtttttg tactctcaag atttaagtaa ctgtacaacc      300
gctatgaatg tcgtattaaa agcttttaag tttttgtact ctcaagattt aagtaactgt      360
acaacgactt agggcgctac ccttaaaaa tagcagtttt tgtactctca agatttaagt      420
aactgtacaa ccttatataa aagaaagaca gaaatattct agtttttgta ctctcaagat      480
ttaagtaact gtacaacaac aatggctaag aaattcagcc ctaacgcggt tttgtactct      540
caagatttaa gtaactgtac aacacgtttc ctaaatgcat gaaaatcgca aacggttttt      600
gtactctcaa gatttaagta actgtacaac cccctacgaa attttaaaac gacccccccg      660
cgtttttgta ctctcaagat ttaagtaact gtacaactac ctacccatgg aacgattact      720
atgcagcgtt tttgtactct caagatttaa gtaactgtac aatgggaagt tataattacg      780
aaaaggtaga tatgtttttg tactctcaag atttaagtaa ctgtacaact atgtcaccac      840
gttgcaaccc tacaccactg tttttgtact ctcaagattt aagtaactgt acaat          895
    
```

20

<210>2

<211> 161

<212> ADN

25

<213> *Streptococcus thermophilus*

<400>2

```

taaatttatt aatatcatcc catcgatctg gttttgtac tctcaagatt taagtaactg      60
tacaacggat aaggcgagac aagaacaact taagcagttt ttgtactctc aagatttaag      120
taactgtaca acgogacat gtaacgcgg tagaaatagc g          161
    
```

30

ES 2 499 032 T3

<210>3
 <211> 161
 <212> ADN
 5 <213> *Streptococcus thermophilus*
 <400> 3
 ggataaggcg agacaagaac aacttaagca gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg 60
 tacaacgcga ccatgtaacg ccggtagaaa tagcggtttt tgtactctca agatttaagt 120
 aactgtacaa ccaagggagt cgaaccctg acagccaaca a 161
 10
 <210>4
 <211> 161
 <212> ADN
 15 <213> *Streptococcus thermophilus*
 <400> 4
 gcgaccatgt aacgccgta gaaatagcgg tttttgtact ctcaagattt aagtaactgt 60
 acaaccaagg gagtcgaacc cctgacagcc aacaagtttt tgtactctca agatttaagt 120
 aactgtacaa ccgctatgaa tgtcgtatta aaagctttta a 161
 20
 <210>5
 <211> 162
 <212> ADN
 25 <213> *Streptococcus thermophilus*
 <400> 5
 caagggagtc gaaccctga cagccaacaa gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg 60
 tacaaccgct atgaatgtcg tattaagaagc ttttaagttt ttgtactctc aagatttaag 120
 taactgtaca acgacttagg gcgctacccc ttaaaaatag ca 162
 30
 <210>6
 <211> 162
 <212> ADN
 35 <213> *Streptococcus thermophilus*
 <400>6
 cgctatgaat gtcgtattaa aagcttttaa gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg 60
 tacaacgact tagggcgcta ccccttaaaa atagcagttt ttgtactctc aagatttaag 120
 taactgtaca accttatata aaagaaagac agaaatattc ta 162
 40
 <210>7
 <211> 162
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*
 <400> 7

ES 2 499 032 T3

gacttagggc gctaccacctt aaaaatagca gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg 60

tacaacctta tataaaagaa agacagaaat attctagttt ttgtactctc aagatttaag 120

taactgtaca acaacaatgg ctaagaaatt cagccctaac gc 162

<210>8
 <211> 163
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 8

cttatataaa agaaagacag aaatattcta gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg 60

tacaacaaca atggctaaga aattcagccc taacgcggtt ttgtactctc aagatttaag 120

taactgtaca acacgtttcc taaatgcatg aaaatcgcaa acg 163

<210>9
 <211> 164
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 9

aacaatggct aagaaattca gccctaacgc gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg 60

tacaacacgt ttctaaatg catgaaaatc gcaaacggtt tttgtactct caagatttaa 120

gtaactgtac aaccccctac gaaattttaa aacgaccccc ccgc 164

<210> 10
 <211> 164
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 10

acgttttcta aatgcatgaa aatcgcaaac ggtttttgtc ctctcaagat ttaagtaact 60

gtacaacccc ctacgaaatt ttaaaacgac cccccgcgt tttgtactct tcaagattta 120

agtaactgta caactaccta cccatggaac gattactatg cagc 164

<210> 11
 <211> 163
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 11

cccctacgaa attttaaaac gacccccccg cgtttttgtc ctctcaagat ttaagtaact 60

gtacaactac ctacccatgg aacgattact atgcagcgtt tttgtactct caagatttaa 120

gtaactgtac aatgggaagt tataattacg aaaaggtaga tat 163

<210> 12
 <211> 162
 <212> ADN

ES 2 499 032 T3

<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 12

tacctacca tggaacgatt actatgcagc gttttgtac tctcaagatt taagtaactg 60

tacaatggga agttataatt acgaaaaggt agatatgttt ttgtactctc aagatttaag 120

taactgtaca actatgtcac cacgttgcaa ccctacacca ct 162

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cepa de *Streptococcus thermophilus*, en la que dicha cepa es la cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada según el Tratado de Budapest el 7 de octubre de 2008 en nombre de Danisco Deutschland GmbH del Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número DSM 21892 o un mutante de la misma, en la que el genoma de dicha cepa mutante comprende un locus CRISPR que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en 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, SEC ID N°9, SEC ID N°10, SEC ID N°11, y SEC ID N°12 y en la que la leche fermentada con dicha cepa mutante tiene una viscosidad mayor de aproximadamente 55 Pa.s cuando se mide con el Ensayo A y un Tiempo de Rotura Caber menor de aproximadamente 0,015 segundos cuando se mide con el Ensayo B.
- 10 2. La cepa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el genoma de dicha cepa comprende un locus CRISPR que tiene la secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 1 o un derivado de la misma que tiene una identidad de al menos 90% con la SEC ID N° 2.
- 15 3. La cepa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que dicha cepa es insensible a fagos.
- 20 4. La cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada según el Tratado de Budapest el 7 de Octubre de 2008 en nombre de Danisco Deutschland GmbH del Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número DSM 21892.
- 25 5. Una composición bacteriana que comprende una cepa como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 30 6. Un método de preparación de productos lácteos fermentados, en el que dicho método comprende la fermentación de un sustrato lácteo con una cepa como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o con una composición bacteriana como se define en la reivindicación 5.
- 35 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el sustrato lácteo es leche natural o reconstituída, descremada u otra, a un medio a base de leche o un medio a base de productos de origen lácteo.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que el sustrato lácteo comprende componentes normalmente utilizados para la preparación de postres lácteos, en particular componentes sólidos tales como frutas, trocitos de chocolate o cereales; productos edulcorados o chocolates líquidos.
- 40 9. Un producto lácteo que puede obtenerse por el método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.
- 45 10. El uso de una cepa como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o de una composición bacteriana como se define en la reivindicación 5 para la preparación de productos lácteos fermentados.
11. Un producto lácteo que comprende una cepa como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una composición bacteriana como se define en la reivindicación 5.
- 50 12. El producto lácteo de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que dicho producto lácteo es una leche fermentada, un yogur, una crema madurada, un queso, un queso fresco, una bebida láctea, un concentrado de un producto lácteo, un queso fundido, un postre de crema, un requesón, o una leche para lactantes.
13. El producto lácteo de acuerdo con la reivindicación 9, 11 o 12, en el que dicho producto lácteo comprende leche de origen animal y/o vegetal.

Figura 1

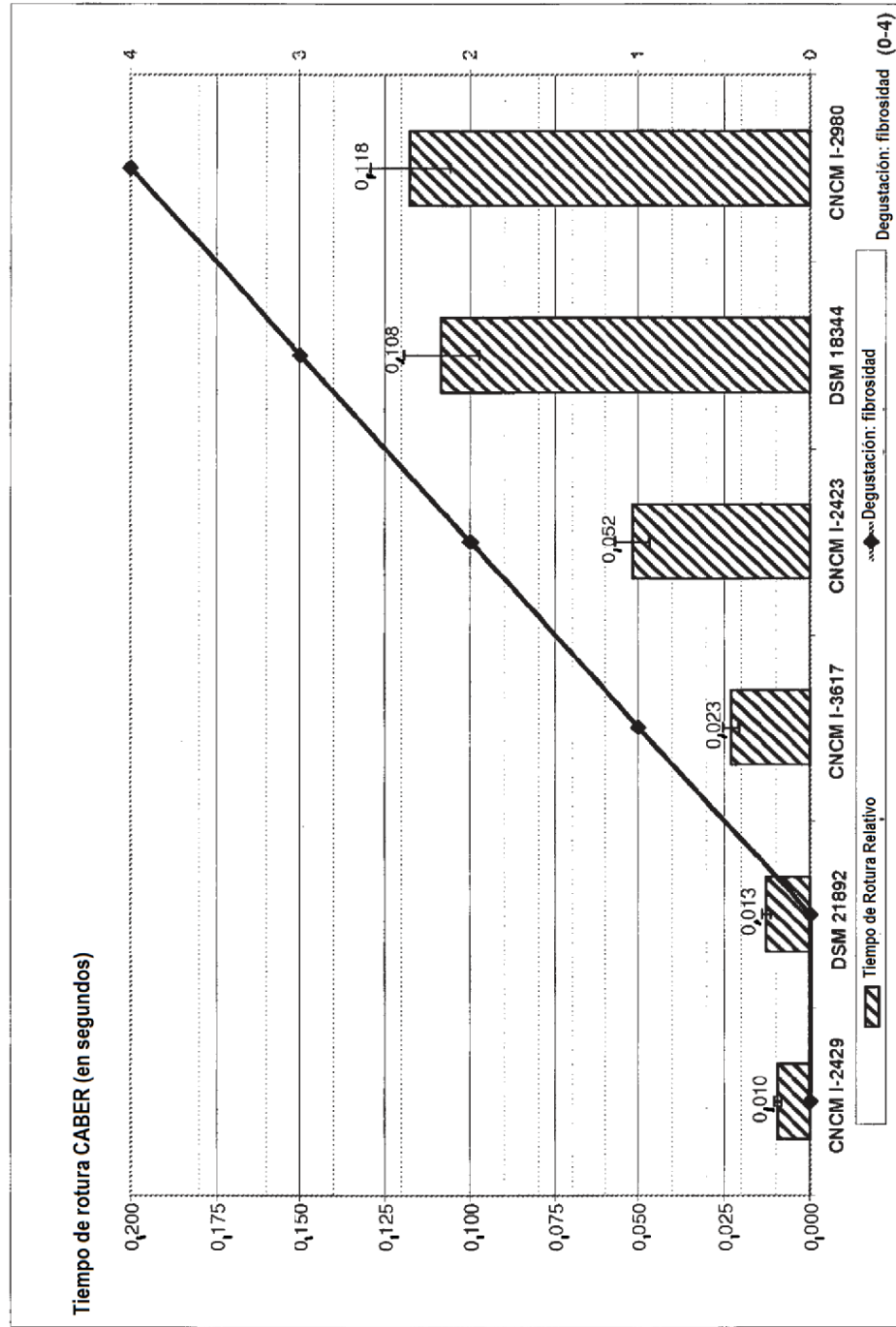


Figura 2

