

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 220**

51 Int. Cl.:

**A23C 9/12** (2006.01)

**C12N 9/12** (2006.01)

**C12R 1/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.09.2010 PCT/EP2010/062808**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2011 WO11026863**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2010 E 10751643 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2473058**

54 Título: **Bacteria láctica con expresión de galactoquinasa modificada para texturizar productos alimentarios porsobreexpresión de exopolisacáridos**

30 Prioridad:

**01.09.2009 DK 200900984**  
**28.01.2010 DK 201000070**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.11.2017**

73 Titular/es:

**CHR. HANSEN A/S (100.0%)**  
**Boege Allé 10-12**  
**2970 Hoersholm, DK**

72 Inventor/es:

**JANZEN, THOMAS y**  
**CHRISTIANSEN, DITTE ELLEGAARD**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 644 220 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Bacteria láctica con expresión de galactoquinasa modificada para texturizar productos alimentarios por sobreexpresión de exopolisacáridos

5

Campo de invención

[0001] La presente invención se refiere a una célula bacteriana con propiedad texturizante, cultivos iniciadores que comprenden la célula y productos lácteos fermentados con el cultivo iniciador.

10

Antecedentes de la invención

[0002] La industria alimentaria usa numerosas bacterias, en particular bacterias lácticas, para mejorar el sabor y la textura de los alimentos pero también para extender el tiempo de conservación de estos alimentos. En el caso de la industria láctea, las bacterias lácticas se usan intensivamente para provocar la acidificación de la leche (por fermentación) pero también para texturizar el producto al que se incorporan.

15

[0003] Entre las bacterias lácticas usadas en la industria alimentaria, se puede mencionar los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Bifidobacterium*. Las bacterias lácticas de las especies *Streptococcus thermophilus* se usan en gran parte solas o en combinación con otras bacterias para la producción de productos alimentarios, en particular productos fermentados. En particular se usan en la formulación de fermentos usados para la producción de leches fermentadas, por ejemplo yogures. Algunas de ellas desempeñan un papel dominante en el desarrollo de la textura del producto fermentado. Esta característica está estrechamente ligada a la producción de polisacáridos. Entre las cepas de *Streptococcus thermophilus* es posible distinguir cepas texturizantes y no texturizantes.

20

25

[0004] Para cumplir los requisitos de la industria, se ha vuelto necesario proponer nuevas cepas texturizantes de bacterias lácticas, en particular de *Streptococcus thermophilus*.

30

[0005] WO2007095958A1 divulga cepas de *Streptococcus thermophilus* con propiedades texturizantes. En la figura 1 se puede observar que la cepa más texturizante CHCC8833 (DSM17876) tiene un valor de tensión de cizallamiento de alrededor de 59 Pa.

35

[0006] Robitaille *et al.*, J Dairy Sci. 92: 477-482 (2009) divulga un estudio que muestra que es posible aumentar la producción de EPS por cepas de *Streptococcus thermophilus* filantes o "ropy" a través de ingeniería genética mediante el aumento de la actividad de GalK, es decir, por transformación con un plásmido que sobreexpresa GalK.

40

Se concluye que cuando tal cepa se usa en combinación con *Lactobacillus bulgaricus* para la producción de yogur, la sobreproducción de EPS de la cepa recombinante no es significativa. Robitaille *et al.*, J Dairy Sci. 90(9):4051-4057 (2007) y Vaillancourt *et al.*, App Envir Microbiol. 70(8):4596-4603 (2004) también revelan la producción de derivados galactosa positivos de *Streptococcus thermophilus* por transformación con un plásmido que sobreexpresa GalK de *Strep. Salivarius*. Las cepas modificadas o bien no mostraron un aumento significativo en la producción de EPS en la leche (Robitaille) o la producción de EPS no se analizó (Vaillancourt). De Vin *et al.*, Appl Environ Microbiol. 71(7):3659-3667 (2005) divulga un análisis molecular y bioquímico del fenotipo de galactosa de varias cepas de *Streptococcus thermophilus* de productos lácteos, entre otros de las secuencias de nucleótidos según se encuentran en la región intergénica galR-galK que incluye la región -10.

45

[0007] Por lo tanto, el problema que la invención propone resolver es proporcionar una cepa de bacteria láctica que tenga unas buenas propiedades de texturización de productos alimentarios, especialmente productos en los que la cepa texturizante de la bacteria láctica (tal como *Streptococcus thermophilus*) se usa junto con una cepa de una especie de *Lactobacillus*.

50

Resumen de la invención

[0008] Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que las bacterias ácido lácticas con mutaciones en el gen GalK (galactoquinasa) generan una viscosidad más alta en leche fermentada que la cepa (madre) de tipo salvaje, especialmente cuando se usan para la fermentación de leche junto con bacterias *Lactobacillus*.

55

[0009] Conforme a este hallazgo sorprendente, la presente invención se refiere a cepas de bacterias ácido lácticas supertexturizantes novedosas, tales como cepas de *S. thermophilus*, con mutaciones en el gen GalK, y un método para la producción de estas cepas, y para fermentar productos lácteos fabricados utilizando tales cepas.

60

Descripción detallada

65

[0010] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para la fabricación de una bacteria ácido láctica (tal como una bacteria que genera una viscosidad más alta en leche fermentada en comparación con la cepa madre, o tal como una bacteria que genera una viscosidad en leche fermentada mayor de aproximadamente 70 Pa (por ejemplo mayor de 71 o mayor de 73 Pa, medida como tensión de cizallamiento después de 12 horas de crecimiento a 37 grados C), que comprende:

- a) Proporcionar una cepa bacteriana de ácido láctico como cepa madre;
- b) introducir una mutación en el gen GalK de la cepa; y
- c) seleccionar mediante cribado una cepa mutante que genere una viscosidad en leche fermentada superior a aproximadamente 70 Pa medida como tensión de cizallamiento después de 12 horas de crecimiento a 37 grados.

[0011] De este modo, formas de realización del primer aspecto son:

– Un método para la fabricación de una bacteria ácido láctica que genera una viscosidad más alta en leche fermentada en comparación con la cepa madre (por ejemplo, medida como tensión de cizallamiento, tal como después de 12 horas de crecimiento a 37 grados C) que comprende:

- a) proporcionar una cepa bacteriana de ácido láctico como cepa madre;
- b) introducir una mutación en el gen GalK de la cepa; y
- c) seleccionar mediante cribado una cepa mutante que genere una viscosidad en leche fermentada superior a aproximadamente 70 Pa medida como tensión de cizallamiento después de 12 horas de crecimiento a 37 grados.

– Un método para la fabricación de una bacteria ácido láctica que genera una viscosidad en leche fermentada mayor de aproximadamente 70 Pa (por ejemplo medida como tensión de cizallamiento, tal como después de 12 horas de crecimiento a 37 grados C) que comprende:

- a) proporcionar una cepa bacteriana de ácido láctico como cepa madre;
- b) introducir una mutación en el gen GalK de la cepa;
- c) seleccionar mediante cribado una cepa mutante que genere una viscosidad en leche fermentada superior a aproximadamente 70 Pa medida como tensión de cizallamiento después de 12 horas de crecimiento a 37 grados.

[0012] En formas de realización preferidas actualmente, la viscosidad se mide como tensión de cizallamiento después de 12 horas de crecimiento a 37 grados C, y/o como se mide en el ensayo descrito más adelante. De este modo, una forma de realización actualmente preferida del primer aspecto de la invención es un método para la fabricación de una bacteria ácido láctica que comprende:

- a) proporcionar una cepa bacteriana de ácido láctico como cepa madre;
- b) introducir una mutación en el gen GalK de la cepa;
- c) seleccionar mediante cribado una cepa mutante que genere una viscosidad en leche fermentada superior a aproximadamente 70 Pa medida como tensión de cizallamiento después de 12 horas de crecimiento a 37 grados.

[0013] El método de la invención puede comprender además una o más fase(s) seleccionada(s) del grupo consistente en:

- c1) selección por cribado de una cepa mutante que genere textura, tal como una cepa que genere más textura que la cepa madre, o que aumente la viscosidad de un sustrato de leche; y
- c2) selección por cribado de una cepa mutante con fenotipo Gal+, tal como actividad de degradación/fermentación de galactosa mejorada en comparación con la cepa madre.

[0014] La mutación se puede introducir en la región promotora del gen, tal como en la región -10 (la caja de Pribnow) del gen.

[0015] En una forma de realización interesante del método de la invención, la mutación produce la sustitución de una o ambas de C y G en la región de tipo salvaje -10 que tiene la secuencia de nucleótidos TACGAT con un nucleótido independientemente seleccionado del grupo consistente en A y T.

[0016] La mutación puede suponer la sustitución de C de la región de tipo salvaje -10 (TACGAT) con un nucleótido independientemente seleccionado del grupo consistente en A y T.

[0017] En una forma de realización, la mutación resulta en la sustitución de C de la región de tipo salvaje -10 que tiene la secuencia de nucleótidos TACGAT con T, y/o la mutación resulta en una región -10 que tiene la secuencia de nucleótidos TATGAT, TATTAT o TACTAT.

[0018] La mutación se puede introducir usando técnicas de ingeniería genética, y/o usando mutagénesis, por ejemplo por radiación o tratamiento con una sustancia química, opcionalmente seguida de un análisis del gen GalK para verificar la mutación en dicho gen GalK.

[0019] La bacteria (la cepa madre) se puede seleccionar de un género del grupo consistente en *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Bifidobacterium*. Una bacteria interesante pertenece a la especie *Streptococcus thermophilus*.

[0020] También se describe una bacteria ácido láctica que se puede obtener mediante el método de la invención.

[0021] Asimismo, la invención se refiere a una bacteria ácido láctica que genera una viscosidad en leche fermentada mayor de aproximadamente 70 Pa (por ejemplo mayor de 71 Pa o 73 Pa) medida como tensión de cizallamiento después de 12 horas de crecimiento a 37 grados C. En otro aspecto, la presente invención se refiere a una bacteria ácido láctica que lleva una mutación en la región -10 del gen GalK (en comparación con la región de tipo salvaje -10 que tiene la secuencia de nucleótidos TACGAT), donde la mutación resulta en una región -10 que tiene la secuencia de nucleótidos TATTAT (SEC ID NO:3) o TACTAT (SEC ID NO:4). También se describe una bacteria ácido láctica que lleva una mutación en la región -10 del gen GalK, mutación que produce la sustitución de C en la región de tipo salvaje -10, que tiene la secuencia de nucleótidos TACGAT, con un nucleótido independientemente seleccionado del grupo consistente en A y T. La mutación puede suponer la sustitución de C en la región de tipo salvaje -10, que tiene la secuencia de nucleótidos TACGAT, con T.

[0022] En una forma de realización interesante, una bacteria ácido láctica de la invención comprende SEC ID NO:5, o la región promotora de la misma, incluyendo la región -35 y la región -10. La bacteria ácido láctica pertenece preferiblemente a la especie *Streptococcus thermophilus*.

[0023] En otra forma de realización, la invención se refiere a una cepa bacteriana de la especie *Streptococcus thermophilus*, seleccionada del grupo consistente en: CHCC11379 (DSM 22884), CHCC11342 (DSM 22932) y CHCC11976 (DSM 22934). También se describen todas las cepas nuevas que se mencionan aquí, al igual que sus mutantes.

[0024] En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende bacterias ácido lácticas de la invención, tales como bacterias de la cepa CHCC11379 (DSM 22884). Se prefiere que tal composición comprenda al menos  $10 \times 10^9$  UFC (unidades formadoras de colonias) de dichas bacterias.

[0025] La composición puede comprender, o bien como una mezcla o como un conjunto de elementos,

- una cepa de una especie de *Lactobacillus*, tal como una cepa de *L. Bulgaricus* o *L. Fermentum*; y
- una cepa de una bacteria ácido láctica de la invención, tal como una cepa que pertenece a la especie *Streptococcus thermophilus*.

[0026] Ahora se prefiere que la cepa que pertenece a una especie de *Lactobacillus* sea una cepa de un polisacárido (tal como un heteropolisacárido, homopolisacárido) y/o una enzima fructosiltransferasa que produce especies de *Lactobacillus*.

[0027] La composición puede comprender al menos  $10 \times 10^9$  UFC (unidades formadoras de colonias) de una cepa que pertenece a una especie de *Lactobacillus*; y al menos  $10 \times 10^9$  UFC de una cepa de la especie *Streptococcus thermophilus*.

[0028] La composición preferiblemente se puede utilizar como cultivo iniciador, y está en forma congelada, liofilizada o líquida.

[0029] En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la producción de un producto lácteo/derivado de leche fermentado, que comprende fermentar un sustrato de leche (tal como leche de vaca) con una bacteria ácido láctica, una cepa, o una composición de la invención.

[0030] El método puede comprender además fermentar el sustrato de leche con una cepa que pertenece a una especie de *Lactobacillus*, tal como una cepa de *L. Bulgaricus* o *L. Fermentum*, por ejemplo una cepa seleccionada del grupo consistente en LB18, CHCC10019 (DSM19252), CHCC2008 (DSM22584) o CHCC3984 (DSM19251). También se describen mutantes y variantes de cualquiera de estas cepas.

[0031] El sustrato de leche se puede fermentar con una cepa o bacteria de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, tal como una cepa perteneciente a la especie *Streptococcus thermophilus* antes, durante o después de la fermentación con una cepa perteneciente a una especie de *Lactobacillus*.

[0032] El método puede comprender añadir una enzima al sustrato de leche antes, durante y/o después de la

fermentación, tal como una enzima seleccionada del grupo consistente en: una enzima capaz de entrecruzar proteínas, transglutaminasa, una proteasa aspártica, quimosina y cuajo.

5 [0033] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un producto lácteo, tal como un producto lácteo fermentado (por ejemplo yogur o suero de mantequilla) o un queso (por ejemplo, queso fresco o pasta hilada), obtenible mediante el método de la invención. El producto lácteo fermentado puede ser, por ejemplo, un producto de tipo batido o un producto de tipo firme.

10 [0034] El producto lácteo puede comprender opcionalmente un ingrediente seleccionado del grupo consistente en: un concentrado de fruta, un jarabe, un cultivo bacteriano probiótico, un agente de coloración, un agente espesante, un agente aromatizante y un agente conservante; y/o que opcionalmente está en forma de un producto de tipo batido, un producto de tipo firme o un producto bebible.

15 [0035] La invención también se refiere a un producto lácteo, que se fabrica fermentando un sustrato de leche (tal como leche de vaca) con una bacteria ácido láctica de la invención (por ejemplo una cepa de la especie *Streptococcus thermophilus*, tal como DSM 22884) y una bacteria ácido láctica de una especie seleccionada de *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus fermentum* (tal como CHCC10019 (DSM19252), CHCC3984 (DSM19251) y CHCC2008 (DSM22584)).

20 [0036] Un producto lácteo interesante de la invención tiene una viscosidad superior a 100 Pa (por ejemplo superior a 102 o superior a 104 Pa), medida como tensión de cizallamiento, por ejemplo después de 12 horas de crecimiento a 37 grados C. En una forma de realización preferida actualmente, la viscosidad superior a 100 Pa se obtiene solo por el crecimiento de las células bacterianas, pero se pueden obtener valores de viscosidad más altos mediante la adición de compuestos químicos, tales como gelatina, una carragenina, etc.

25 Definiciones

30 [0037] Como se utiliza en este caso, el término "bacteria ácido láctica" designa una bacteria grampositiva microaerofílica o anaeróbica que fermenta azúcares con la producción de ácidos incluyendo ácido láctico como el ácido predominantemente producido, ácido acético y ácido propiónico. Las bacterias ácido lácticas más útiles desde el punto de vista industrial se encuentran en el orden "Lactobacillales", que incluye *Lactococcus*, spp. *Streptococcus*, spp. *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudoleuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium*, spp. *Enterococcus* spp. y *Propionibacterium* spp. Adicionalmente, las bacterias productoras de ácido láctico del grupo de las bacterias anaeróbicas estrictas, las bifidobacterias, por ejemplo *Bifidobacterium* spp., generalmente se incluyen en el grupo de las bacterias ácido lácticas. Estas se usan frecuentemente como cultivos alimentarios solos o en combinación con otras bacterias ácido lácticas. Las bacterias ácido lácticas, incluyendo bacterias de las especies *Lactobacillus* spp. y *Streptococcus thermophilus*, normalmente se suministran a la industria láctea o bien como cultivos congelados o liofilizados para la propagación de iniciadores a granel o como cultivos denominados "Direct Vat Set" (SVD), destinados a la inoculación directa en una cuba de fermentación o tina para la producción de un producto lácteo, tal como un producto de leche fermentado. A tales cultivos en general se les denomina "cultivos iniciadores" o "iniciadores".

45 [0038] El término "leche" se debe entender como la secreción láctea obtenida por el ordeño de cualquier mamífero, tal como vacas, ovejas, cabras, búfalas o camellas. En una forma de realización preferida, la leche es leche de vaca. El término leche también incluye soluciones de proteína/grasa obtenidas a partir de materiales vegetales, por ejemplo leche de soja.

50 [0039] El término "sustrato de leche" puede ser cualquier material de leche crudo y/o procesado que se pueda someter a fermentación según el método de la invención. De este modo, los sustratos de leche útiles incluyen, pero de forma no limitativa, soluciones/suspensiones de cualquier leche o productos lácteos que comprenden proteínas, tales como leche de grasa entera o leche con bajo contenido en grasa, leche desnatada, suero de mantequilla, leche en polvo reconstituida, leche condensada, leche seca, suero de leche, permeato de suero de leche, lactosa, líquido madre de cristalización de lactosa, concentrado de proteína de suero de leche, o nata. Obviamente, el sustrato de leche puede proceder de cualquier mamífero, por ejemplo leche de mamífero sustancialmente pura, o leche en polvo reconstituida.

60 [0040] Antes de la fermentación, el sustrato de leche se puede homogeneizar y pasteurizar según métodos conocidos en la técnica.

[0041] "Homogenización" como se utiliza en este caso significa una mezcla intensiva para obtener una suspensión o emulsión soluble. Si la homogeneización se realiza antes de la fermentación, se puede realizar para descomponer la grasa láctea en tamaños menores de modo que ya no se separe de la leche. Esto se puede lograr haciendo pasar la leche a través de unos pequeños orificios a alta presión.

65 [0042] "Pasteurizar" como se utiliza en este caso significa tratar el sustrato de leche para reducir o eliminar la

presencia de organismos vivos, tales como microorganismos. Preferiblemente, la pasteurización se logra manteniendo una temperatura específica durante un periodo de tiempo específico. La temperatura específica normalmente se logra mediante calentamiento. La temperatura y la duración se pueden seleccionar de modo que maten o inactiven determinadas bacterias, tales como bacterias nocivas. Un paso de enfriamiento rápido se puede realizar a continuación.

[0043] "Fermentación" en los métodos de la presente invención significa la conversión de carbohidratos en alcoholes o ácidos mediante la acción de un microorganismo. Preferiblemente, la fermentación en los métodos de la invención comprende la conversión de lactosa en ácido láctico.

[0044] Los procesos de fermentación para ser usados en la producción de productos lácteos fermentados son conocidos y el experto en la técnica sabrá seleccionar las condiciones del proceso adecuadas, tales como temperatura, oxígeno, cantidad y características de los microorganismo(s) y tiempo de proceso. Obviamente, las condiciones de fermentación se seleccionan de modo que ayuden a lograr la presente invención, es decir, obtener un producto lácteo en forma sólida o líquida (producto lácteo fermentado).

[0045] El término "producto de tipo batido" se refiere específicamente a un producto lácteo fermentado que se somete a un tratamiento mecánico después de la fermentación, dando como resultado una desestructuración y licuefacción de la cuajada formada en la fase de fermentación. El tratamiento mecánico se obtiene típicamente pero no exclusivamente por agitación, bombeo, filtrado u homogenización del gel, o mezclándolo con otros ingredientes. Los productos de tipo batido tienen típicamente pero no exclusivamente un contenido sólido no graso de leche del 9 al 15%.

[0046] El término "producto de tipo firme" incluye un producto basado en leche al que se ha inoculado un cultivo iniciador, por ejemplo un cultivo iniciador, y que se ha envasado tras el paso de inoculación y luego fermentado en el envase.

[0047] En el presente contexto, el término "mutante" debería entenderse como una cepa derivada de una cepa de la invención mediante, por ejemplo, ingeniería genética, radiación y/o tratamiento químico. Se prefiere que la mutante sea una mutante equivalente funcionalmente, por ejemplo una mutante que tiene sustancialmente las mismas propiedades, o mejoradas (por ejemplo con relación a la textura, tensión de cizallamiento, viscosidad, rigidez del gel, recubrimiento de la boca, sabor, post-acidificación, velocidad de acidificación, y/o robustez de fago), que la cepa madre. Según la invención, la mutante genera una viscosidad en la leche fermentada superior a aproximadamente 70 Pa medida como la tensión de cizallamiento después de 12 horas de crecimiento a 37 grados. Dicha mutante forma parte de la presente invención. Especialmente, el término "mutante" se refiere a una cepa obtenida sometiendo a una cepa de la invención a cualquier tratamiento de mutagenización usado de forma convencional incluyendo un tratamiento con un mutágeno químico tal como etano metano sulfonato (EMS) o N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG), luz UV o a una mutante originada de forma espontánea. Una mutante se puede someter a más tratamientos de mutagenización (un único tratamiento debería entenderse como una etapa de mutagenización seguida de una etapa de cribado/selección), pero actualmente se prefiere que no se realicen más de 20, o no más de 10, o no más de 5 tratamientos (o pasos de cribado/selección). En una mutante descrita, menos del 5%, o menos del 1% o incluso menos del 0,1% de los nucleótidos en el genoma bacteriano se han cambiado por otro nucleótido, o eliminado, en comparación con la cepa madre. En el presente contexto, el término "variante" debería entenderse como una cepa que es funcionalmente equivalente a una cepa de la invención, por ejemplo que tiene sustancialmente las mismas propiedades, o mejoradas, por ejemplo con relación a la textura, tensión de cizallamiento, viscosidad, rigidez del gel, recubrimiento de la boca, sabor, post-acidificación, velocidad de acidificación, y/o robustez de fago). Tales variantes, que se puede identificar utilizando las técnicas de selección apropiadas, se describen en este documento.

[0048] En el presente contexto, la "textura" se mide como la tensión de cizallamiento después de 12 horas de crecimiento a 37 grados C. Un ensayo para utilizar para realizar un análisis de la textura:

El día después de la incubación, la leche fermentada se puso a 13°C y se agitó suavemente con una varilla equipada con un disco perforado hasta que se logró la homogeneidad de la muestra. Las propiedades reológicas de la muestra se evaluaron en un reómetro (StressTech, Reologica Instruments, Suecia) equipado con un sistema de medición coaxial C25. La prueba de viscosimetría se hizo con índices de cizallamiento variables de 0,27 a 300 1/s en 21 pasos. Los índices de cizallamiento se aumentaron y luego se redujeron y se registraron las curvas ascendentes y descendentes de tensión de cizallamiento y viscosidad aparente. El retraso y los tiempos de integración fueron 5 s y 10 s, respectivamente.

[0049] El uso de los términos "un/a" y "el/la/los/las" y referentes similares en el contexto de cuando se describe la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se debe interpretar teniendo en cuenta que cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario de manera específica o el contexto lo contradiga claramente. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" se deben interpretar como términos abiertos (es decir, con el significado de "que incluye, pero no está limitado a") a menos que se especifique lo contrario. La enumeración de rangos de valores en este documento está

meramente destinada a servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado decreciente dentro del rango, a menos que se indique lo contrario de manera explícita, y cada valor separado se incorpora a la especificación como si hubiera sido mencionado individualmente. Todos los métodos aquí descritos se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquier ejemplo y de todos los ejemplos, o de expresiones de ejemplificación (por ejemplo, "tal(es) como" ), proporcionados en este documento está destinado meramente a aclarar más la invención y no plantea una limitación del alcance de la invención a menos que se indique lo contrario. No se debe interpretar que ninguna expresión de la especificación indique que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.

## Leyendas

[0050] La Figura 1 representa la tensión de cizallamiento de CHCC11379 medida con el reómetro StressTech. Los resultados muestran una textura mejorada (tensión de cizallamiento) en leche coagulada con CHCC11379 después de crecimiento durante una noche a 43 grados C. La textura se cuantificó mediante la evaluación de la tensión de cizallamiento medida en pascales (Pa) usando un reómetro StressTech como se describe en "Análisis de la textura en leche fermentada"

## Ejemplos

### *Ejemplo 1 Preparación de una mutante galactosa positiva de una cepa de Streptococcus*

#### Aislamiento de la cepa fermentadora de galactosa

[0051] Se aislaron mutantes como la mutante fermentadora de galactosa de la cepa de *S. thermophilus* CHCC6008 (=ST6008, DSM18111). Las células de CHCC6008 no se mutagenizaron con ningún compuesto mutagénico ni por luz UV antes del paso de aislamiento de mutantes. Las cepas aisladas, por lo tanto, se parecen a mutantes galactosa positivas espontáneas de CHCC6008.

[0052] Antes del aislamiento de las mutantes, CHCC6008 se sembró por estriado en placas de agar M17 con 2% de galactosa (placas M17-gal). CHCC6008 no creció en la galactosa como única fuente de carbohidrato.

[0053] Después de una noche, los cultivos de CHCC6008 se colocaron en placas M17-gal y se pudieron aislar varias colonias después de dos días de crecimiento a 37°C. Varias mutantes se purificaron en placas M17-gal y se volvieron a evaluar en caldo M17 que contenía 2% de galactosa como el único carbohidrato.

[0054] Mientras que CHCC6008 no disminuyó el pH del caldo M17-gal significativamente, CHCC11379, una de las mutantes purificadas, alcanzó un pH de 5.3 después de 10 horas a 37 °C, y por lo tanto se la consideró una mutante de CHCC6008 fermentadora de galactosa.

[0055] Las cepas CHCC11342 y CHCC11976 se aislaron de la misma manera.

#### Aislamiento de mutantes por ingeniería genética

[0056] Las mutantes galactosa positivas también pueden ser generadas por mutagénesis dirigida. Se utilizan oligonucleótidos que llevan el nucleótido mutado dentro de la caja promotora de galK -10 para amplificar un fragmento de ADN específico por PCR. El fragmento de PCR que lleva la mutación deseada se clona en un plásmido vector y se transforma en la cepa de *S. thermophilus* deseada, y la mutación se integra en el cromosoma y se intercambia la región promotora de galK de tipo salvaje por recombinación. El aislamiento de cepas se realiza como se ha descrito antes.

#### Análisis de la textura en leche fermentada

[0057] El día después de la incubación, la leche fermentada se puso a 13°C y se agitó suavemente mediante una varilla equipada con un disco perforado hasta que se alcanzó la homogeneidad de la muestra. Las propiedades reológicas de la muestra se evaluaron en un reómetro (StressTech, Reologica Instruments, Suecia) equipado con un sistema de medición coaxial C25.

[0058] La prueba de viscosimetría se hizo con unos índices de cizallamiento variables de 0,27 a 300 1/s en 21 pasos. Los índices de cizallamiento se aumentaron y se redujeron y se registraron las curvas ascendentes y descendentes de tensión de cizallamiento y viscosidad aparente.

[0059] Los tiempos de retraso e integración fueron 5 s y 10 s, respectivamente. Para posteriores análisis, se eligió una tensión de cizallamiento a 300 s<sup>-1</sup>. Los resultados del reómetro mostraron que CHCC11379 tenía una tensión de cizallamiento mejorada en un 10% en comparación con CHCC6008 (valor de tensión de cizallamiento

de 74,0 Pa (pascales) para CHCC11379 en comparación con 67,5 Pa para la cepa madre CHCC6008, véase Fig. 1).

Análisis de la textura en leche

5 [0060] En otro experimento se usó CHCC11379 como parte de un cultivo de yogur donde se cocultivaron cepas de *S. thermophilus* en leche desnatada a 43 °C junto con una cepa de la especie *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*.

10 Cuando la única diferencia en la producción de yogur fue el uso de CHCC11379 en vez de CHCC6008 de tipo salvaje, la tensión de cizallamiento también aumentó en un 10% (105,0 Pa para el cultivo de yogur que contenía CHCC11379 en comparación con 94,7 Pa para el cultivo de yogur que contenía CHCC6008).

Secuenciación de la región promotora de galK de CHCC11379

15 [0061] Para revelar el tipo de mutación para la mutante gal positiva de CHCC11379 se secuenció el principio del gen galK (que codifica la galactoquinasa de *S. thermophilus*).

20 [0062] Para CHCC11379 se identificó una mutación en la región promotora de galK (véase a continuación). La mutación respectiva muy probablemente llevará a una actividad promotora más fuerte en comparación con la cepa madre 6008, lo que explica el fenotipo gal positivo observado. Esto se basa en el hecho de que la secuencia de consenso para la caja promotora-10 es "TATAAT", y de que una mutación en el nucleótido 3 de la caja (región) -10 para CHCC6008 ("TACGAT") lleva a una caja -10 con una similitud mayor a la secuencia de consenso en CHCC11379 ("TATGAT").

```

CHCC11379  AAAAATATTGATTTTCCATGTGAAAGGGGTTATGATTTTCAGTATAAACAAAAAGAATAAGTGAGATACATC  SEQ ID NO:5
CHCC6008   AAAAATATTGATTTTCCATGTGAAAGGGGTTACGATTTTCAGTATAAACAAAAAGAATAAGTGAGATACATC  SEQ ID NO:6
AY704368  AAAAATATTGATTTTCCATGTGAAAGGGGTTACGATTTTCAGTATAAACAAAAAGAATAAGTGAGATACATC  SEQ ID NO:7
Consenso  AAAAATATTGATTTTCCATGTGAAAGGGGTTACGATTTTCAGTATAAACAAAAAGAATAAGTGAGATACATC  SEQ ID NO:8
          -35                -10                RBS
    
```

25 [0063] Región promotora del gen galK de CHCC11379. La mutación puntual en el promotor de galK de CHCC11379 se indica con el código de color gris. La secuencia de galK de *S. thermophilus* ST111 publicada (número de depósito Genbank. AY704368) se indica para comparación. -35: región promotora -35; -10: región promotora -10; RBS: sitio de unión al ribosoma.

30

35 [0064] En este documento se describen formas de realización preferidas de esta invención, incluyendo la mejor manera conocida por los inventores de realizar la invención. Puede que a los expertos en la técnica se les ocurran variaciones de esas formas de realización preferidas al leer la descripción precedente. Los inventores esperan que los expertos empleen tales variaciones según sea apropiado, y es la intención de los inventores que la invención se ponga en práctica de formas distintas a las específicamente descritas en este documento. Por consiguiente, esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes del objeto nombrado en las reivindicaciones anexas del presente documento según lo permita la ley aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las variaciones posibles de la misma están incluidos por la invención a menos que se indique lo contrario aquí o que el contexto lo contradiga claramente.

40

**Depósitos y solución experta**

45 [0065] La cepa *Streptococcus thermophilus* CHCC11379 se depositó en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania) con el número de depósito DSM22884, el 26 de agosto de 2009.

50 [0066] Una muestra de la cepa de *Streptococcus thermophilus* (ST) ST6008 (también llamada CHCC6008) se depositó en la DSMZ con el número de depósito DSM 18111 con la fecha de depósito 29 de marzo de 2006. CHCC11342 (DSM 22932) y CHCC11976 (DSM 22934) se depositaron el 8 de septiembre de 2009 en la DSMZ.

[0067] Otros depósitos en DSMZ:

55 CHCC10019 (DSM19252), CHCC3984 (DSM19251): fecha de depósito 3 de abril de 2007,  
 CHCC2008 (DSM22584): fecha de depósito 19 de mayo de 2009,

[0068] Los depósitos se hicieron bajo las condiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes.



[0069] El solicitante pide que una muestra de los microorganismos depositados se ponga a disponibilidad únicamente de un experto aprobado por el solicitante.

5 Referencias

[0070]

Appl. Environ, Microbiol. 71, 7, p. 3659-67 (2005)

10 International Journal of Food Microbiology 113 (2007) 195-200

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Feb. 2002, p. 784-790

J Dairy Sci 92: 477-482 (2009)

WO2008/040734A1, WO2007/025097A2, US7241610B2, WO2007/144770A2,

WO2004/085607A, WO2008/148561A

15

LISTADO DE SECUENCIAS

[0071]

20 <110> Chr. Hansen A/S

<120> Bacterias

<130> P3652PC00

<150> DK 2009 00984

<151> 2009-09-01

25 <160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 6

<212> ADN

30 <213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 1

tacgat 6

<210> 2

<211> 6

35 <212> ADN

<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 2

tatgat 6

<210> 3

40 <211> 6

<212> ADN

<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 3

tattat 6

45 <210> 4

<211> 6

ES 2 644 220 T3

<212> ADN  
 <213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 4  
 tactat 6

5 <210> 5  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 5

10 **aaaatattga ttttccatgt gaaaggggtt atgatttcag tataaacaaa aagaataagt 60**  
**gagatacatc 70**

<210> 6  
 <211> 70  
 <212> ADN

15 <213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 6

**aaaatattga ttttccatgt gaaaggggtt acgatttcag tataaacaaa aagaataagt 60**  
**gagatacatc 70**

<210> 7  
 <211> 70  
 <212> ADN

20 <213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 7

**aaaatattga ttttccatgt gaaaggggtt acgatttcag tataaacaaa aagaataagt 60**  
**gagatacatc 70**

25

<210> 8  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> *Streptococcus thermophilus*

30 <400> 8

**aaaatattga ttttccatgt gaaaggggtt acgatttcag tataaacaaa aagaataagt 60**  
**gagatacatc 70**

**REVINDICACIONES**

- 5 1. Método para la fabricación de una bacteria ácido láctica que comprende:
- a) proporcionar una cepa bacteriana de ácido láctico como la cepa madre;
  - b) introducir una mutación en el gen GalK de la cepa; y
  - c) seleccionar por cribado una cepa mutante que genere una viscosidad más alta en leche fermentada en comparación con la cepa madre medida como tensión de cizallamiento después de 12 horas de crecimiento a 37 grados C.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, donde la mutación produce la sustitución de una o ambas de C y G en la región de tipo salvaje -10 que tiene la secuencia de nucleótidos TACGAT (SEC ID NO:1) con un nucleótido independientemente seleccionado del grupo consistente en A y T.
- 15 3. Método según la reivindicación 2, donde la mutación resulta en una región -10 que tiene la secuencia de nucleótidos TATGAT (SEC ID NO:2), TATTAT (SEC ID NO:3) o TACTAT (SEC ID NO:4).
- 20 4. Método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la bacteria pertenece a la especie *Streptococcus thermophilus*.
5. Bacteria ácido láctica que lleva una mutación en la región -10 del gen GalK, donde la mutación resulta en una región -10 que tiene la secuencia de nucleótidos TATTAT (SEC ID NO:3) o TACTAT (SEC ID NO:4).
- 25 6. Cepa bacteriana de la especie *Streptococcus thermophilus*, seleccionada del grupo que consiste en: CHCC11379 depositada en la DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH con el número de depósito DSM 22884; CHCC11342 depositada en la DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH con el número de depósito DSM 22932, y CHCC11976 depositada en la DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH con el número de depósito DSM 22934.
- 30 7. Composición que comprende una bacteria ácido láctica según la reivindicación 5 o una cepa bacteriana según la reivindicación 6.
- 35 8. Composición que comprende, o bien como una mezcla o como un conjunto de elementos,
- una cepa de una bacteria ácido láctica según la reivindicación 5 o una cepa bacteriana según la reivindicación 6; y
  - una cepa de una especie de *Lactobacillus*.
- 40 9. Método para la producción de un producto lácteo/derivado de la leche, que comprende fermentar un sustrato de leche con una bacteria ácido láctica según la reivindicación 5, una cepa bacteriana según la reivindicación 6, o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 7-8.
- 45 10. Método según la reivindicación 9, donde dicha especie de *Lactobacillus* es una cepa de *L. Bulgaricus* o *L. Fermentum*, preferiblemente una cepa seleccionada del grupo consistente en LB18; CHCC10019 depositada en la DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH con el número de depósito DSM19252; CHCC2008 depositada en la DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH con el número de depósito DSM22584, o CHCC3984 depositada en la DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH con el número de depósito DSM19251.
- 50 11. Producto lácteo o producto de leche fermentado que comprende la bacteria ácido láctica según la reivindicación 5 o la cepa bacteriana según la reivindicación 6.

55

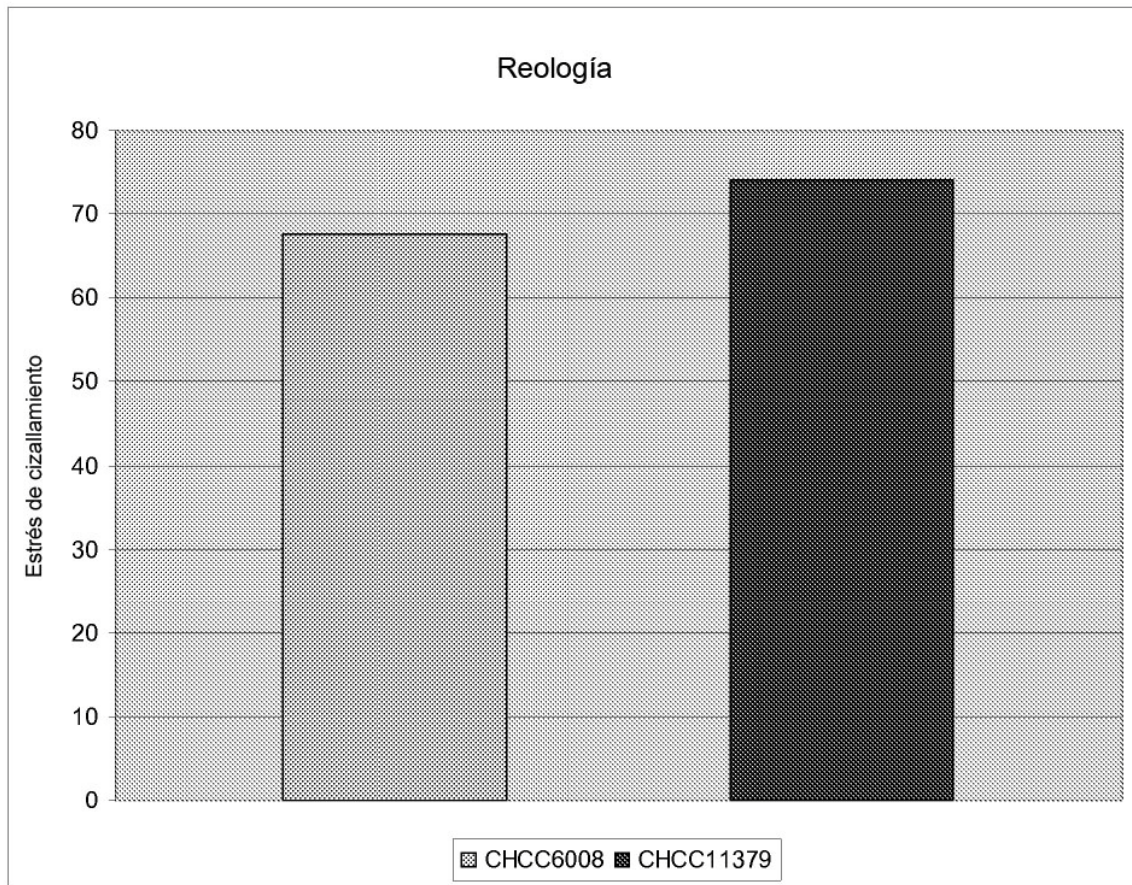


Fig. 1