

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 900**

51 Int. Cl.:

**C12R 1/46** (2006.01)

**A23C 9/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2011 PCT/EP2011/051239**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2011 WO11092300**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2011 E 11703847 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2529035**

54 Título: **Bacteria láctica para texturizar productos alimentarios seleccionada en base a la resistencia a fagos**

30 Prioridad:

**19.11.2010 DK 201001051**  
**01.10.2010 DK 201000894**  
**01.09.2010 WO PCT/EP2010/062808**  
**11.06.2010 DK 201000519**  
**29.01.2010 DK 201000081**  
**28.01.2010 DK 201000070**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.06.2018**

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:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 672 900 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 para texturizar productos alimentarios seleccionada en base a la resistencia a fagos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una célula bacteriana que tiene resistencia a fagos mejorada, cultivos iniciadores que comprenden la célula, y productos lácteos fermentados con el cultivo iniciador.

10 **Antecedentes de la invención**

La industria alimentaria usa numerosas bacterias, en particular bacterias lácticas, para mejorar el sabor y la textura de alimentos, pero también para extender la vida útil de estos alimentos. En el caso de la industria láctea, las bacterias lácticas se usan intensamente para producir la acidificación de la leche (por fermentación), pero también para texturizar el producto en el que se incorporan.

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

El documento WO2007095958A1 divulga cepas de *Streptococcus thermophilus* con propiedades texturizantes. En la figura 1 se puede ver que la cepa más texturizante CHCC8833 (DSM17876) tiene un valor de tensión de corte de aproximadamente 59 Pa.

Vedamuthu et al: "Involvement of a plasmid in production of ropiness mucoidness in milk cultures by *Streptococcus cremoris* MS", Applied and Environmental Microbiology, vol. 51, no. 4, 1986, páginas 677-682 discute la capacidad de cepas para producir una mucosidad que proporciona una consistencia viscosa en productos lácteos fermentados. Se sugiere el uso de tales cepas para la producción de productos de leche agria escandinavos extremadamente viscosos tal como taette, lang mjolk sueco y villii finés.

Akcelik & Sanlibaba: "Characterization of an exopolysaccharide preventing phage adsorption in *Lactococcus lactis* subsp. cremoris MA39", Turkish Journal Veterinary Animal Science, vol. 26, 2002, páginas 1151-1156 divulga *Lactococcus lactis* subsp. cremoris cepa MA39 que produce un polisacárido extracelular que contiene ramnosa, glucosa y galactosa. Mientras que se encontró que el polisacárido prevenía la adsorción de fagos, la publicación no divulga que la resistencia a fagos pueda contribuir a las propiedades de texturización de una cepa de ácido láctico.

Robitaille et al: "Fat-free yogurt made using a galactose-positive exopolysaccharide-producing recombinant strain of *Streptococcus thermophilus*", Journal Of Dairy Science, American Dairy Science Association, US, vol. 92, no. 2, 1 de febrero 2009, páginas 477-482 describe la generación de la cepa productora de exopolisacárido (EPS) RD-534-S1 que tiene un plásmido con un gen galk recombinante. Cuando se usó un cultivo iniciador con la cepa RD-534-S1 para producir yogur, no se observó viscosidad aumentada relativa a un cultivo iniciador que comprende la cepa madre RD-534 que no incluía el gen galk.

Vaillancourt et al: "Characterization of a galactokinase-positive recombinant strain of *Streptococcus thermophilus*", Applied And Environmental Microbiology, American Society For Microbiology, US, vol. 70, no. 8, 1 de agosto 2004, páginas 4596-4603 divulga una cepa recombinante de *Streptococcus thermophilus* y su potencial uso como un cultivo iniciador para productos lácteos. La publicación ni menciona las propiedades texturizantes de esta cepa ni la relevancia de la resistencia a fagos para la capacidad de una cepa para conferir textura a productos lácteos.

Para cumplir los requisitos de la industria, se ha hecho necesario proporcionar cepas texturizantes novedosas de bacterias lácticas, en particular de *Streptococcus thermophilus*, para texturizar productos alimentarios. En especial hay una necesidad para una cepa texturizante novedosa de *Streptococcus thermophilus* que se pueda usar junto con una cepa de una especie de *Lactobacillus*. Otra necesidad de la industria es que la cepa sea resistente a los bacteriófagos normalmente encontrados en la industria alimentaria.

60 **Compendio de la invención**

Los presentes inventores han proporcionado un grupo novedosos de bacterias del ácido láctico de las especies *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, que sorprendentemente es más resistente al ataque de fago que la cepa (madre) de la que se obtienen. Además, sorprendentemente ha resultado que este grupo de bacterias

genera mayor tensión de corte y/o firmeza de gel que la cepa madre cuando las bacterias se usan para fermentar leche.

5 Es sorprendente que una cepa mutante resistente a fagos genere más textura, por ejemplo, mayor tensión de corte y/o firmeza de gel, (cuando la cepa se usa para fermentar leche) que la cepa madre, y es especialmente sorprendente que una cepa mutante resistente a fagos que (también) contiene una mutación en el gen *galK* (relativa a la cepa de tipo salvaje) genere más textura (cuando la cepa se usa para fermentar leche) que la cepa madre.

10 Según los sorprendentes hallazgos anteriores, la presente invención se refiere a un método para fabricar una bacteria de ácido láctico texturizante cribando para mutantes resistentes a fagos de una cepa madre e introduciendo una mutación en la secuencia reguladora de *galK* de la cepa. Más específicamente, la invención se refiere a un método para fabricar una bacteria de ácido láctico (por ejemplo, una bacteria que, además de ser, por ejemplo, resistente a fagos, resistente sustancial a fagos y/o poseer resistencia a fagos aumentada comparada con la cepa madre, es más texturizante que la cepa madre), que comprende las etapas de:

15 a) proporcionar una cepa bacteriana de ácido láctico (la cepa madre);  
 b) exponer la cepa madre a un bacteriófago que es capaz de lisar la cepa madre;  
 c) aislar una cepa mutante de la cepa madre, cepa mutante que no es lisada por el bacteriófago;  
 20 d) introducir una mutación en la secuencia reguladora de *galK* de la cepa antes, durante y/o después de la etapa b);

en donde dicha cepa mutante genera mayor tensión de corte y/o firmeza de gel que la cepa madre cuando se usa para fermentar leche.

25 La invención también se refiere a cepas bacterianas texturizantes que pertenecen a las especies *Streptococcus thermophilus* o *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que se han obtenido por el método anterior. También se proporcionan composiciones que comprenden estas cepas y métodos para producir un producto de leche fermentada que hace uso de estas cepas.

### 30 **Divulgación detallada**

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para fabricar una bacteria de ácido láctico (que es, por ejemplo, resistente a fagos, resistente sustancial a fagos y/o posee resistencia aumentada a fagos comparada con la cepa madre, y que genera mayor tensión de corte y/o firmeza de gel que la cepa madre cuando las bacterias se usan para fermentar leche), que comprende las etapas de:

35 a) proporcionar una cepa bacteriana de ácido láctico (la cepa madre);  
 b) exponer la cepa madre a un bacteriófago que es capaz de lisar la cepa madre;  
 c) aislar una cepa mutante de la cepa madre, cepa mutante que no es lisada por el bacteriófago;  
 40 d) introducir una mutación en la secuencia reguladora de *galK* de la cepa antes, durante y/o después de la etapa b);

en donde dicha cepa mutante genera mayor tensión de corte y/o firmeza de gel que la cepa madre cuando se usa para fermentar leche.

45 La mutación introducida en la secuencia reguladora de *galK* (por ejemplo, promotor) de la cepa se puede introducir, por ejemplo, por tratamiento químico o tratamiento de radiación, o por medio de técnicas de ingeniería genética antes, durante, o después de la etapa b) del método anterior.

50 En una forma de realización interesante, un método de la invención comprende las etapas de:

- proporcionar una cepa bacteriana de ácido láctico (la cepa madre);  
 - mutar (por ejemplo, por tratamiento químico o tratamiento de radiación, o por medio de técnicas de ingeniería genética) la cepa madre;  
 55 - exponer la cepa bacteriana láctica resultante a un bacteriófago que es capaz de lisar la cepa madre, tal como un fago seleccionado del grupo que consiste en CHPC658, CHPC1057, CHPC1089 y CHPC1152;  
 - incubar las células bacterianas expuestas en un medio de cultivo; y  
 - aislar una cepa mutante de la cepa madre, cepa mutante que no es lisada por el bacteriófago.

60 El método de la invención puede producir una mutación que se introduce en la región promotora del gen *galK*, tal como en la región -10 (la caja de Pribnow) o en la región entre la caja de Pribnow y el sitio de unión al ribosoma.

Además, el método de la invención puede llevar a una mutación que produce una actividad fermentadora de galactosa aumentada comparada con la cepa madre.

65

La mutación puede producir la sustitución de uno o más nucleótidos en la región entre la caja de Pribnow y el sitio de unión al ribosoma del gen *galK*, tal como la sustitución de C en la secuencia TTCAGT después de la caja de Pribnow de tipo salvaje con un nucleótido seleccionado del grupo que consiste en A, T y G.

5 En otra forma de realización, la mutación puede producir:

- la sustitución de uno o más nucleótidos en la región entre la caja de Pribnow y el sitio de unión al ribosoma del gen *galK*, tal como la sustitución de C en la secuencia TTCAGT (SEQ ID NO: 6) después de la caja de Pribnow de tipo salvaje con un nucleótido seleccionado del grupo que consiste en A, T y G; y/o
- 10 - la sustitución de una o ambas de C y G en la región -10 de tipo salvaje (TACGAT, SEQ ID NO: 7) con un nucleótido seleccionado independientemente del grupo que consiste en A y T; y/o
- la sustitución de C de la región -10 de tipo salvaje (TACGAT, SEQ ID NO: 7) con un nucleótido seleccionado independientemente del grupo que consiste en A y T; y/o
- la sustitución de C de la región -10 de tipo salvaje (TACGAT, SEQ ID NO: 7) con T; y/o
- 15 - una región -10 que tiene la secuencia de nucleótidos TATGAT (SEQ ID NO: 8), TATTAT (SEQ ID NO: 9) o TACTAT (SEQ ID NO: 10).

20 Se debe entender que la cepa madre usada en un método de la invención puede ser una cepa *gal+*, preferiblemente una cepa que es capaz de reducir el pH en un valor de al menos 1,0 después de 16 horas de incubación a 37 grados C en M17 con galactosa al 2% (galactosa añadida como único hidrato de carbono), inoculada en una cantidad de al menos 10E4 células por ml de medio. Los ejemplos en tal cepa es una cepa en donde:

- uno o más nucleótidos en la región entre la caja de Pribnow y el sitio de unión al ribosoma del gen *galK* se han sustituido, tal como la sustitución de C en la secuencia TTCAGT (SEQ ID NO: 6) después de la caja de Pribnow de tipo salvaje con un nucleótido seleccionado del grupo que consiste en A, T y G; y/o
- 25 - una o ambas de C y G en la región -10 de tipo salvaje (TACGAT, SEQ ID NO: 7) se ha sustituido con un nucleótido seleccionado independientemente del grupo que consiste en A y T; y/o
- C de la región -10 de tipo salvaje (TACGAT, SEQ ID NO: 7) se ha sustituido con un nucleótido seleccionado independientemente del grupo que consiste en A y T; y/o
- 30 - C de la región -10 de tipo salvaje (TACGAT, SEQ ID NO: 7) se ha sustituido con T; y/o
- la región -10 tiene la secuencia de nucleótidos TATGAT (SEQ ID NO: 8), TATTAT (SEQ ID NO: 9) o TACTAT (SEQ ID NO: 10).

35 El método de la invención puede comprender una o más etapa(s) adicional(es) seleccionada(s) del grupo que consiste en:

- c1) cribar para una cepa mutante que tiene resistencia a fagos, tal como resistencia a fagos aumentada comparada con la cepa madre; y
- c2) cribar para una cepa mutante que tiene fenotipo *Gal+*, tal como actividad degradante de galactosa aumentada comparada con la cepa madre.

40 Una forma de realización del método de la presente invención se refiere a un método para fabricar una bacteria de ácido láctico, que comprende las etapas de:

- proporcionar una cepa bacteriana de ácido láctico (cepa madre);
- mutar la cepa madre introduciendo una mutación en la secuencia reguladora de *galK* de la cepa;
- exponer la cepa madre mutada a un bacteriófago que es capaz de lisar la cepa madre, tal como un fago seleccionado del grupo que consiste en CHPC658, CHPC1057, CHPC1089 y CHPC1152;
- 45 - opcionalmente incubar las células bacterianas expuestas con un medio de cultivo; y
- cribar para una cepa mutante que tenga resistencia a fagos, tal como resistencia a fagos aumentada comparada con la cepa madre.

50 La cepa mutante obtenida por un método de la invención puede ser un mutante espontáneo, un mutante obtenido por mutagénesis de la cepa madre por medio de, por ejemplo, tratamiento químico o tratamiento de radiación, o un mutante obtenido por medio de técnicas de ingeniería genética. Un mutante interesante de la invención es un mutante de CHCC6008, esp. un mutante que es *gal+* y resistente frente a CHPC1152.

55 En una forma de realización del método de la invención, la cepa mutante es resistente a fagos, resistente sustancial a fagos y/o posee resistencia aumentada a fagos comparada con la cepa madre, y en donde el fago se selecciona del grupo que consiste en: un bacteriófago que es capaz de lisar la cepa madre, CHPC658, CHPC1057, CHPC1089 y CHPC1152.

60 Se prefiere que la bacteria (la cepa madre) se seleccione de una especie seleccionada del grupo que consiste en *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp. (por ejemplo, *Streptococcus thermophilus*), *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudoleuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Propionibacterium* spp. y *Bifidobacterium* spp.

En una forma de realización interesante de un método de la invención, la bacteria (la cepa madre) se selecciona de una cepa que tiene una o más características seleccionadas del grupo que consiste en: capacidad para texturizar leche, capacidad para producir un polisacárido, tal como un exopolisacárido o un polisacárido capsular, capacidad para crear viscosidad cuando se incubaba en leche, y capacidad para aumentar la tensión de corte cuando se incubaba en leche.

La solicitud también divulga bacterias de ácido láctico o cepas que son obtenibles por un método de la invención.

Tales bacterias o cepas pueden generar una viscosidad en leche fermentada mayor de aproximadamente 70 Pa (pascal) (tal como mayor de 73 Pa, mayor de 77 Pa o mayor de 79 Pa, o mayor de 80 Pa), medida como tensión de corte después de 12 horas de crecimiento a 37 grados C, por ejemplo, inoculada en una cantidad de al menos 10E4 células por ml de leche. Se cree que es posible obtener cepas que generan una viscosidad en leche fermentada de hasta 100 Pa, hasta 120 Pa, hasta 150 Pa, o incluso hasta 200 Pa. Ejemplos de intervalos para la viscosidad obtenible son: de 70 a 200 Pa, de 75 a 150 Pa, de 78 a 120 Pa, de 79 a 100 Pa, y de 80 a 90 Pa. En especial, la presente invención se refiere a una cepa de *S. thermophilus*, que es capaz de generar una viscosidad de 79 a 100 Pa en leche fermentada.

Más específicamente, la invención proporciona una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Streptococcus thermophilus*, seleccionada del grupo que consiste en: CHCC11977 (DSM22935), y CHCC13140 (DSM 24023). Específicamente la presente invención se refiere a la cepa CHCC11977.

La presente invención también se refiere a una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Lb delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, dicha cepa se selecciona del grupo que consiste en CHCC12813 (DSM24074) y CHCC12841. Cepas interesantes son las que generan una tensión de corte en leche fermentada mayor de aproximadamente 60 Pa (tal como mayor de 65 Pa, mayor de 69 Pa o mayor de 72 Pa), medida después de 12 horas de crecimiento a 37 grados C, por ejemplo, inoculada en una cantidad de al menos 10E4 células por ml de leche. Especialmente interesantes son esas que generan una tensión de corte en leche fermentada en el intervalo desde 60 a 100 Pa (tal como de 65 a 90 Pa, desde 69 a 85 Pa o desde 72 a 80 Pa), medida después de 12 horas de crecimiento a 37 grados C, por ejemplo, inoculada en una cantidad de al menos 10E4 células por ml de leche.

En un aspecto aún adicional la solicitud divulga una bacteria de ácido láctico o cepa o mutante o variante de la invención, que genera una firmeza de gel en leche fermentada mayor de aproximadamente 110 Pa (tal como mayor de 115, mayor de 120 o mayor de 125 Pa), medida después de 12 horas de crecimiento a 37 grados C, por ejemplo, inoculada en una cantidad de al menos 10E4 células por ml de leche. Es actualmente preferido que la firmeza del gel esté en el intervalo de 110 a 200 Pa, o más preferido en el intervalo de 120 a 190 Pa o de 125 a 180 Pa. La bacteria o cepa puede pertenecer a las especies especie *Streptococcus thermophilus* o *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Especialmente, se divulga una cepa de *S. thermophilus*, que es capaz de generar una firmeza de gel de 125 a 175 Pa en leche fermentada.

En una forma de realización adicional, la presente invención se refiere a una bacteria o cepa de ácido láctico, que pertenece a la especie *Lb delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Ejemplos interesantes en esta forma de realización son una bacteria o cepa, que genera una viscosidad en leche fermentada mayor de aproximadamente 60 Pa (tal como mayor de 65 Pa, mayor de 69 Pa o mayor de 72 Pa), medida como tensión de corte después de 12 horas de crecimiento a 37 grados C, por ejemplo, inoculada en una cantidad de al menos 10E4 células por ml de leche y/o una bacteria o cepa que genera una viscosidad en leche fermentada en el intervalo desde 60 a 100 Pa (tal como de 65 a 90 Pa, desde 69 a 85 Pa o desde 72 a 80 Pa), medida como tensión de corte después de 12 horas de crecimiento a 37 grados C, por ejemplo, inoculada en una cantidad de al menos 10E4 células por ml de leche.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende bacterias de ácido láctico o una cepa de la invención, tal como bacterias que pertenecen a la cepa CHCC11977. Se prefiere que tal composición comprenda al menos 10exp10 UFC (unidades formadoras de células) de dichas bacterias.

En una forma de realización, la composición puede comprender, sea como una mezcla o como un kit de partes,

- una cepa que pertenece a una especie de *Lactobacillus*, tal como una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (sinónimo: *Lactobacillus bulgaricus*), una *L. johnsonii*, o una *L. fermentum*; y
- una cepa de una bacteria de ácido láctico de la invención, tal como una cepa que pertenece a la especie *Streptococcus thermophilus*, por ejemplo, una cepa seleccionada del grupo que consiste en CHCC11977 (DSM22935), y CHCC13140 (DSM 24023),

tal como una composición en donde la cepa que pertenece a una especie de *Lactobacillus* es una cepa que pertenece a una especie de *Lactobacillus* productora de polisacárido (tal como un heteropolisacárido, homopolisacárido) y/o enzima fructosil transferasa.

La composición de la invención puede comprender al menos  $10 \times 10^8$  UFC (unidades formadoras de células) de una cepa que pertenece a una especie de *Lactobacillus*; y/o al menos  $10 \times 10^8$  UFC de una cepa que pertenece a la especie *Streptococcus thermophilus*.

5 En una forma de realización interesante, la composición de la invención comprende al menos  $10 \times 10^8$  UFC (unidades formadoras de células) de una cepa que pertenece a una especie de *Lactobacillus* productora de polisacárido (tal como un heteropolisacárido, homopolisacárido) y/o enzima fructosil transferasa; y al menos  $10 \times 10^8$  UFC de una cepa que pertenece a la especie *Streptococcus thermophilus*.

10 La composición puede ser utilizable como un cultivo iniciador, y puede estar en forma congelada, liofilizada o líquida.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para producir un producto de leche fermentada, que comprende fermentar un sustrato de leche (tal como leche de vaca) con una bacteria de ácido láctico de la invención, una cepa de la invención, o una composición de la invención.

15 Este 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 que consiste en CHCC10019, CHCC10935 o CHCC3984, y mutantes y variantes de cualquiera de estas cepas. Por ejemplo, el sustrato de leche se fermenta con una composición, cepa o bacteria de la invención, tal como una cepa que pertenece a la especie *Streptococcus thermophilus* antes, durante o después de la fermentación con una cepa que pertenece a una especie de *Lactobacillus*, o el sustrato de leche se fermenta con una cepa o bacteria que pertenece a la especie *Streptococcus thermophilus* durante la fermentación con una cepa que pertenece a una especie de *Lactobacillus*.

25 El método de la invención para producir un producto de leche fermentada puede comprender añadir una enzima al sustrato de leche antes, durante y/o después de la fermentación, tal como una enzima seleccionada del grupo que consiste en: una enzima capaz de entrecruzar proteínas, transglutaminasa, una aspártico proteasa, quimosina, y cuajo.

30 El método se puede usar para producir un producto lácteo, tal como un producto de leche fermentada (por ejemplo, yogur o suero de mantequilla) o un queso (por ejemplo, queso fresco o de pasta hilada). El producto de leche fermentada puede ser, por ejemplo, un producto de tipo batido, un producto bebible, un producto de tipo firme. El producto lácteo puede opcionalmente comprender un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en: un concentrado de fruta, un jarabe, un cultivo bacteriano probiótico, un agente colorante, un agente espesante, un agente saborizante, y un agente conservante.

35 Por tanto, se divulga un producto de leche fermentada obtenible por el método de la invención, que opcionalmente comprende un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en: un concentrado de fruta, un jarabe, un cultivo bacteriano probiótico, un agente colorante, un agente espesante, un agente saborizante, y un agente conservante; y/o que opcionalmente está en la forma de un producto de tipo batido, un producto de tipo firme, o un producto bebible.

40 También se divulga un producto lácteo, que está hecho fermentando un sustrato de leche (tal como leche de vaca) con una bacteria de ácido láctico de la invención (por ejemplo, una cepa que pertenece a la especie *Streptococcus thermophilus*, tal como DSM22884) y una bacteria de ácido láctico, una especie seleccionada de *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus fermentum* (tal como CHCC10019 (DSM19252), CHCC3984 (DSM19251) y CHCC2008 (DSM22584)).

45 En una forma de realización interesante, un producto lácteo preparado por el método de la invención tiene una viscosidad/textura de más de 100 Pa (tal como más de 102 o más de 104 Pa), medida como tensión de corte, por ejemplo, después de 12 horas de crecimiento a 37 grados C en leche. En una forma de realización actualmente preferida, la viscosidad de más 100 Pa se obtiene por crecimiento de las células bacterianas solas, pero se pueden obtener valores de viscosidad mayores por adición de compuestos químicos, tal como almidón, gelatina, un carragenano, etc.

50 En otra forma de realización, el producto lácteo tiene una viscosidad/textura en el intervalo de 100 a 200 Pa, tal como en el intervalo de 100 a 150 Pa, o en el intervalo de 105 a 125 Pa, medido como tensión de corte.

55 En una forma de realización adicional, el producto lácteo es un producto bebible, por ejemplo, yogur para beber.

60 También se divulgan en el presente documento bacteriófagos novedosos utilizables en un método de la invención, tal como un bacteriófago seleccionado del grupo que consiste en CHPC658 (DSM 23961), CHPC1057, CHPC1089 y CHPC1152 (DSM 23994), y mutantes y variantes de los mismos, tal como mutantes y variantes que son capaces de lisar las cepas mencionadas en el presente documento, por ejemplo, la cepa CHCC6008.

65

Además, se divulgan cepas bacterianas novedosas, utilizables como cepas madre en un método de la invención, tal como cepas seleccionadas del grupo que consiste en CHCC11342 (DSM22932), CHCC10019 (DSM19252), CHCC11379 (DSM 22884), CHCC11976 (DSM 22934), y mutantes de las mismas.

5 Como se usa en el presente documento, el término "bacteria de ácido láctico" designa una bacteria gram positiva, microaerofílica o anaerobia, que fermenta azúcares con la producción de ácidos incluyendo ácido láctico como el ácido predominantemente producido, ácido acético y ácido propiónico. Las bacterias de ácido láctico industrialmente más útiles 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. Además, bacterias que producen ácido láctico que pertenecen al grupo de las bacterias anaerobias estrictas, bifidobacterias, es decir, *Bifidobacterium* spp., en general se incluyen en el grupo de bacterias de ácido láctico. Estas se usan con frecuencia como cultivos alimenticios solas o en combinación con otras bacterias de ácido láctico. Las bacterias de ácido láctico, incluyendo bacterias de las especies *Lactobacillus* sp. y *Streptococcus thermophilus*, normalmente se suministran a la industria láctea o bien como cultivos congelados o liofilizados para la propagación iniciadora en masa o como se denomina cultivos "Direct Vat Set" (DVS), que se pretenden para inoculación directa en un recipiente de fermentación o vat para la producción de un producto lácteo, tal como un producto de leche fermentada. Tales cultivos en general se denominan "cultivos iniciadores" o "iniciadores".

20 El término "leche" se debe entender como la secreción láctea obtenida ordeñando cualquier mamífero, tal como vacas, ovejas, cabras, búfalos o camellos. En una forma de realización preferida, la leche es leche de vaca. El término leche también incluye soluciones de proteína/grasa hechas de materiales vegetales, por ejemplo, leche de soja.

25 El término "sustrato de leche" puede ser cualquier material de leche cruda y/o procesada que se puede someter a fermentación según el método de la invención. Por tanto, los sustratos de leche útiles incluyen, pero no están limitados a, soluciones/suspensiones de cualquier leche o productos similares a leche que comprenden proteína, tal como leche entera o semidesnatada, leche desnatada, suero de mantequilla, leche en polvo reconstituida, leche condensada, leche seca, suero, filtrado de suero, lactosa, líquido madre de la cristalización de lactosa, concentrado de proteína de suero, o nata. Obviamente, el sustrato de leche se puede originar de cualquier mamífero, por ejemplo, es leche de mamífero sustancialmente pura, o leche en polvo reconstituida.

Preferiblemente, al menos parte de la proteína en el sustrato de leche es proteína natural en la leche, tal como caseína o proteína de suero. Sin embargo, parte de la proteína puede ser proteínas no naturales de la leche.

35 El término "leche" se debe entender como la secreción láctea obtenida ordeñando cualquier mamífero, tal como vacas, ovejas, cabras, búfalos o camellos. En una forma de realización preferida, la leche es leche de vaca.

40 Antes de la fermentación, el sustrato de leche se puede homogeneizar y pasteurizar según métodos conocidos en la técnica.

"Homogeneización" como se usa en el presente documento significa mezclado intensivo para obtener una suspensión soluble o emulsión. Si la homogeneización se realiza antes de la fermentación, se puede realizar de modo que se rompa la grasa de la leche a tamaños menores de modo que no se separe más de la leche. Esto se puede lograr forzando la leche a alta presión a través de orificios pequeños.

50 "Pasteurización" como se usa en el presente documento significa el tratamiento del sustrato de leche para reducir o eliminar la presencia de organismos vivos, tal como microorganismos. Preferiblemente, la pasteurización se logra manteniendo una temperatura especificada durante un periodo de tiempo especificado. La temperatura especificada habitualmente se logra calentando. La temperatura y duración se pueden seleccionar para destruir o inactivar ciertas bacterias, tal como bacterias dañinas. Puede seguir una etapa de enfriamiento rápido.

55 "Fermentación" en los métodos de la presente invención significa la conversión de hidratos de carbono en alcoholes o ácidos mediante la acción de un microorganismo. Preferiblemente, la fermentación en los métodos de la invención comprende la conversión de lactosa a ácido láctico.

60 Los procesos de fermentación que se van a usar en la producción de productos de leche fermentados se conocen bien y el experto en la materia sabrá cómo seleccionar condiciones de proceso adecuadas, tal como temperatura, oxígeno, cantidad y características de microorganismo(s) y tiempo de proceso. Obviamente, las condiciones de fermentación se seleccionan de modo que apoye el logro de la presente invención, es decir, obtener un producto lácteo en forma sólida o líquida (producto de leche fermentada).

65 El término "producto de tipo batido" se refiere específicamente a un producto de leche fermentada que soporta un tratamiento mecánico después de la fermentación, lo que produce una desestructuración y licuación del coágulo formado en la fase de fermentación. El tratamiento mecánico típicamente, pero no exclusivamente, se obtiene por

agitación, bombeo, filtración u homogenización del gel, o mezclándolo con otros ingredientes. Los productos de tipo batido típicamente, pero no exclusivamente tienen un contenido sólido no graso de leche del 9 al 15%.

5 El término “producto de tipo firme” incluye un producto basado en leche que se ha inoculado con un cultivo iniciador, por ejemplo, un cultivo iniciador, y embalado después de la etapa de inoculación y después fermentado en el envase.

10 El término “producto bebible” incluye bebidas tal como “yogur para beber” y similares. El término “yogur para beber” típicamente cubre un producto de leche producido por fermentación mediante la combinación de una especie de *Lactobacillus* y *Streptococcus thermophilus*. El yogur para beber típicamente tiene un contenido sólido no graso de leche del 8% o más. Además, el recuento de cultivo vivo para bebidas de yogur para beber típicamente es al menos 10E6 unidades formadoras de células (UFC) por ml.

15 El “producto bebible” según la presente invención incluye cualquier producto bebible basado en sustratos de leche acidificada, incluyendo por tanto bebidas de leche fermentada y bebidas de yogur líquido. En los métodos de la presente invención, la acidificación se realiza como una fermentación con un microorganismo, opcionalmente se añade un ácido, tal como un ácido orgánico (por ejemplo, ácido láctico, ácido lactobiónico o GDL).

20 Los productos bebibles según la invención son bebibles en el sentido de que están en forma líquida y se consumen como bebidas, es decir, son adecuados para beber en lugar de comerse con una cuchara. “En forma líquida” significa que los productos están en estado fluido de materia mostrando de esta manera una disposición característica para fluir. Por tanto, la forma de un líquido habitualmente está determinada por el envase que llena, al contrario que, por ejemplo, una sustancia de tipo gel, que es blanda, pero no fluye libremente, tal como, por ejemplo, yogur o pudín. Los productos bebibles según la invención pueden tener una viscosidad que permita al consumidor beber los productos usando una paja si lo desea.

30 Un producto bebible según la presente invención puede tener un pH de menos de 4,6, preferiblemente menos de 4,4, más preferiblemente menos de 4,2 e incluso más preferiblemente aproximadamente pH 4 o menos. En un aspecto, el producto bebible tiene un pH de menos de 3,8, tal como menos de 3,6.

35 Un producto bebible según la presente invención puede tener un contenido en grasa del 0 al 2%, preferiblemente por debajo del 1,5%, por debajo del 1% o por debajo del 0,5%, más preferiblemente de aproximadamente el 0,1% o menor. El producto bebible puede tener un contenido sólido no graso de leche de menos del 20%, preferiblemente menos del 8,5%, menos del 8%, menos del 7,5%, menos del 7%, menos del 6,5% o menos del 6%, y más preferiblemente de aproximadamente el 5%.

40 Un producto bebible según la presente invención puede tener un contenido en proteína de entre el 0,5 y el 4%. En un aspecto preferido, el producto bebible tiene un contenido en proteína de por debajo del 1%. En otro aspecto preferido, el producto bebible tiene un contenido en proteína de entre el 2% y el 3%.

45 Un producto bebible según la presente invención puede tener un periodo de validez de más de 7 días, preferiblemente más de 14 días, más preferiblemente más de 28 días, tal como más de 3 meses.

50 Un producto bebible según la presente invención puede tener una estabilidad de sedimentación mejorada. La estabilidad se puede determinar después de haber almacenado el producto bebible durante un número apropiado de días midiendo la altura del suero que se recoge en la superficie debido a sinéresis. También se puede determinar después de sinéresis acelerada, tal como por centrifugación.

55 Para un producto bebible, por ejemplo, yogur para beber, normalmente se necesita un tratamiento de alta cizalla (por ejemplo, homogenización) después de la fermentación para romper la red de proteínas para obtener productos sin grumos, homogéneos y bebibles. La rotura de la red implica que los yogures para beber tienen una estabilidad de sedimentación reducida, lo que produce la sedimentación de proteína en el fondo durante el periodo de validez. Altos niveles de grasa y alto contenido en proteína aumentan la estabilidad de sedimentación, mientras que los productos bajos en grasa (0-0,5% de grasa) con bajos niveles de proteína (1-2,5%) normalmente necesitan la adición de un estabilizador para evitar la sedimentación de proteínas.

60 Como se usa en el presente documento, el término “bacteriófago” tiene su significado convencional como se entiende en la técnica, es decir, un virus que selectivamente infecta una o más bacterias. Muchos bacteriófagos son específicos para un género o especie o cepa particular de bacterias. El término “bacteriófago” es sinónimo del término “fago”. Los bacteriófagos pueden incluir, pero no están limitados a, bacteriófagos que pertenecen a cualquiera de las siguientes familias: Corticoviridae, Cystoviridae, Inoviridae, Leviviridae, Microviridae, Myoviridae, Podoviridae, Siphoviridae, o Tectiviridae. El bacteriófago puede ser un bacteriófago lítico o un bacteriófago lisogénico. Un bacteriófago lítico es uno que sigue la ruta lítica hasta la terminación del ciclo lítico, más que entrar en la ruta lisogénica. Un bacteriófago lítico experimenta replicación vírica que produce lisis de la membrana celular, destrucción de la célula y liberación de partículas bacteriófagas progenie capaces de infectar otras células. Un

bacteriófago lisogénico es uno capaz de entrar en la ruta lisogénica, en la que el bacteriófago se vuelve una parte latente, pasiva del genoma de la célula antes de la terminación del ciclo lítico.

5 En una forma de realización, la bacteria de ácido láctico según la presente invención es resistente a uno o más bacteriófagos o uno o más conjuntos de bacteriófagos, en otra forma de realización, la bacteria del ácido láctico según la presente invención es resistente al mismo bacteriófago al que una cepa depositada según la presente invención es resistente. En el presente contexto, el término “robusto a fago” se usa de forma intercambiable con el término “resistente a fago”.

10 En el presente contexto, el término “mutante” se debe entender como una cepa derivada, o una cepa que puede derivar, de una cepa de la invención (o la cepa madre) por medio de, por ejemplo, ingeniería genética, radiación y/o tratamiento químico. Se prefiere que el mutante sea un mutante funcionalmente equivalente, por ejemplo, un mutante que tiene sustancialmente las mismas propiedades, o mejoradas (por ejemplo, respecto a textura, tensión de corte, viscosidad, firmeza del gel, recubrimiento en boca, sabor, post acidificación, velocidad de acidificación y/o resistencia a fagos) que la cepa madre. Tal mutante es una parte de la presente invención. Especialmente, el término “mutante” se refiere a una cepa obtenida sometiendo una cepa de la invención a cualquier tratamiento de mutagenización convencionalmente usado incluyendo tratamiento con un mutágeno químico tal como sulfonato de etano metano (EMS) o N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG), luz UV, o a un mutante que se produce espontáneamente. Un mutante se puede haber sometido a varios tratamientos de mutagenización (un único tratamiento se debe entender como una etapa de mutagenización seguida por una etapa de cribado/selección), pero es actualmente preferido que no se lleven a cabo más de 20, o no más de 10 o no más de 5 tratamientos (o etapas de cribado/selección). En un mutante actualmente preferido, menos del 5%, o menos del 1% o incluso menos del 0,1% de los nucleótidos en el genoma bacteriano se han cambiado con otro nucleótido, o delecionado, comparado con la cepa madre. En el presente contexto, el término “variante” se debe entender 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, respecto a textura, tensión de corte, viscosidad, firmeza del gel, recubrimiento de boca, sabor, post acidificación, velocidad de acidificación, y/o resistencia a fagos. Tales variantes, que se pueden identificar usando técnicas de cribado apropiadas, son una parte de la presente invención.

30 En el presente contexto, la “textura” se mide como tensión de corte después de 12 horas de crecimiento a 37 grados C. La unidad del SI para tensión de corte y firmeza de gel es pascal (Pa).

Un ensayo que se va a usar para el análisis de la textura:

35 El día después de la incubación, la leche fermentada se llevó a 13°C y se agitó suavemente por medio de una varilla equipada con un disco perforado hasta 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 tasas de cizalla que variaban desde 0,27 a 300 1/s en 21 etapas. Las tasas de cizalla se aumentaron y después disminuyeron y se registraron las curvas ascendentes y descendentes de tensión de corte y viscosidad aparente. Los tiempos de retraso e integración fueron 5 s y 10 s, respectivamente.

45 El uso de los términos “un” y “una” y “el” y “la” y referentes similares en el contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se deben interpretar que cubren tanto el singular como el plural, a menos que se indique otra cosa en el presente documento o claramente se contradiga por el contexto. Los términos “comprender”, “tener”, “incluir” y “contener” se deben interpretar como términos abiertos (es decir, que significan “incluyendo, pero ni limitado a”) a menos que se indique otra cosa. La enumeración de intervalos de valores en el presente documento solamente se pretende para servir como un método abreviado de referirse individualmente a cada valor separado que está en el intervalo, a menos que se indique otra cosa en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la especificación como se si enumerara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique otra cosa en el presente documento o se contradiga claramente de otra manera por el contexto. El uso de cualquiera de los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, “tal como”) proporcionados en el presente documento, se pretende solamente para iluminar mejor la invención y no plantea una limitación en el ámbito de la invención a menos que se reivindique de otra forma. Ninguna expresión en la especificación se debe interpretar como que indica cualquier elemento reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

#### 60 Leyendas a los dibujos

La figura 1 representa la tensión de corte de la cepa positiva para galactosa CHCC11342 y el mutante resistente a fagos positivo para galactosa CHCC11977 medido con el reómetro StressTech. La tensión de corte se midió en leche coagulada después de crecimiento durante la noche en leche a 37°C.

La figura 2 represente la tensión de corte de mutantes resistentes a fagos de CHCC10019 medido con el reómetro StressTech. La tensión de corte se midió en leche coagulada después de crecimiento durante la noche en leche a 37°C.

5 La figura 3 representa la firmeza de gel de CHCC12339, mutante resistente a fago de CHCC9204, medido con el reómetro StressTech. La firmeza del gel se midió en leche coagulada después de crecimiento durante la noche en leche a 37°C.

10 La figura 4 representa la tensión de corte de CHCC13140, mutante resistente a fago de CHCC5086, medido con el reómetro StressTech. La tensión de corte se midió en leche coagulada después de crecimiento durante la noche en leche a 37°C.

## Experimental

15 **Ejemplo 1: Desarrollo de cepas de *Streptococcus thermophilus* resistentes a fago con propiedades de textura mejoradas**

### Desarrollo de CHCC11977

20 La cepa madre CHCC11342 se obtuvo como se describe en el ejemplo 5. La cepa es un mutante de CHCC6008 y se considera que es una cepa de *S. thermophilus* que fermenta galactosa.

25 La cepa CHCC11977 se aisló en una placa de M17 agar después de sembrar 0,1 ml de un M17 sobre un cultivo nocturno de CHCC11342 junto con 0,1 ml del fago CHPC1152 que contenía 10E9 (10exp9) partículas de fago por ml e incubación durante dos días a 37°C. Un mutante, llamado CHCC11977, se purificó por colonia tres veces y se volvió a ensayar en ensayo de placa en placa de M17 agar a 37°C usando el fago CHPC1152 donde se confirmó la resistencia a fago (no se observó ninguna placa).

30 La cepa mutante también se ensayó en caldo M17 a 37°C en presencia del fago CHPC1152. CHCC11977 permaneció resistente a fago también en cultivo líquido, mientras que CHCC11342, como se esperaba, fue atacada por CHPC1152.

35 CHCC11977 también se ensayó en leche a diferentes temperaturas (sin la adición de fago infectante) mostrando una actividad de acidificación comparable a la cepa madre CHCC11342.

### Análisis de textura de CHCC11342 en leche fermentada

40 El día después de la incubación, la leche fermentada se llevó a 13°C y se agitó suavemente por medio de una varilla equipada con un disco perforado hasta 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.

45 La prueba de viscosimetría se hizo con tasas de cizalla que variaban desde 0,27 a 300 1/s en 21 etapas. Las tasas de cizalla se aumentaron y después disminuyeron y se registraron las curvas ascendentes y descendentes de tensión de corte y viscosidad aparente.

Los tiempos de retraso e integración fueron 5 s y 10 s, respectivamente. Para análisis adicional, se eligió tensión de corte a 300 s<sup>-1</sup>.

50 Los resultados del reómetro mostraron que CHCC11342 tenía un valor de tensión de corte de 73,0 Pa comparado con CHCC6008 con un valor de tensión de corte de 68,0 Pa, véase la figura 1.

### Análisis de textura de CHCC11977 en leche fermentada

55 Se obtuvo leche fermentada, y las propiedades relacionadas con la textura se analizaron, como se ha descrito anteriormente para el mutante resistente a fago gal-positivo.

60 Los resultados del reómetro mostraron que CHCC11977 tenía un valor de tensión de corte que estaba además mejorado en el 10% comparado con CHCC11342 (valor de tensión de corte 80,0 Pa para CHCC11977 comparado con 73,0 Pa para la cepa madre CHCC11342, véase la figura 1).

65 Además, la firmeza de gel (G\*) aumentó en el 20% para el mutante resistente a fago CHCC11977 que mostró un valor de 126,0 Pa comparado con CHCC11342 (firmeza de gel 104,0 Pa). Con esto fue posible mejorar los parámetros reológicos importantes tensión de corte y espesor de gel significativamente aislando un mutante resistente a fago de una cepa madre positiva para galactosa.

Secuenciación de la región promotora de galK de CHCC11342

Para revelar el tipo de mutación para el mutante positivo para galactosa CHCC11342 el principio del gen *galK* (que codifica la galactosa quinasa de *S. thermophilus*) se secuenció.

5 Para CHCC11342 se identificó una mutación en la región del promotor de *galK* (véase las secuencias a continuación). La mutación se produjo tres nucleótidos después de la caja del promotor -10 del gen *galK* produciendo un cambio de nucleótido de C a A.

```
CHCC11342 AAAAATATTGATTTCCTATGTGAAAGGGGTACGATTTAGTATAAACAAAAAGAATAAGTGAGATACATC SEQ ID No:1
CHCC6008 AAAAATATTGATTTCCTATGTGAAAGGGGTACGATTTTCAGTATAAACAAAAAGAATAAGTGAGATACATC SEQ ID No:2
AY704368 AAAAATATTGATTTCCTATGTGAAAGGGGTACGATTTTCAGTATAAACAAAAAGAATAAGTGAGATACATC SEQ ID No:3
Consenso AAAAATATTGATTTCCTATGTGAAAGGGGTACGATTTTCAGTATAAACAAAAAGAATAAGTGAGATACATC SEQ ID No:4
```

10 -35 -10 RBS

Región del promotor del gen *galK* de CHCC11342. La mutación puntual en la región del promotor de *galK* de CHCC11342 está indicada con código de color gris. La secuencia publicada de *galK* de *S. thermophilus* ST111 (No. de acceso de Genbank AY704368) se indica por comparación. -35: caja de promotor -35; -10: caja de promotor -10; RBS: sitio de unión al ribosoma.

Mutantes resistentes a fagos adicionales

20 Para revelar una posible relación entre resistencia a fagos y fenotipo positivo para galactosa, se aislaron cinco mutantes resistentes a fagos adicionales en placas de M17 galactosa agar de la cepa CHCC6008 (gal-) que es la cepa madre de CHCC11342 (gal+). Todos los cinco mutantes resistentes a fagos, CHCC11396, CHCC11397, CHCC11398, CHCC11399 y CHCC11340 (resistente al fago CHPC1152) fueron incapaces de fermentar galactosa lo que significa que el fenotipo gal+ no está directamente relacionado con la resistencia a fagos. Por otra parte, se demostró por ensayo en placa que CHCC11342 (gal+) era aún sensible al fago CHPC1152.

**Ejemplo 2: Desarrollo de cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* resistentes a fago con propiedades de textura mejoradas**

30 Se aislaron mutantes resistentes a fagos de la cepa madre CHCC10019 (DSM19252) como sigue:

Los mutantes se recogieron de placas de MRS agar que contenía CaCl<sub>2</sub> 10 mM/MgCl<sub>2</sub> 10 mM después de sembrar 0,1 ml de un cultivo nocturno de MRS de CHCC10019 junto con 0,1 ml de una lisado de fago CHPC658 que contenía 10E6 partículas de fago por ml e incubación anaerobia durante dos días a 37°C. Se aislaron treinta mutantes y se ensayaron en la prueba de siembra en estrías cruzada, hacia el fago CHPC658. Aparecieron veintinueve mutantes resistentes en la prueba de estrías cruzadas, y después de ello se purificaron tres veces por colona en placas de MRS agar a 37°C.

40 Los 29 mutantes se ensayaron en placas de microtitulación para perfil de acidificación y resistencia a fagos. Se prepararon dos placas de microtitulación con leche y cada placa se inoculó con el 2% del mutante respectivo. Para una placa, se añadió peptona al 2%-diluyente de sal (control) a cada pocillo, y a la otra placa de microtitulación se añadió CHPC658 al 2% que contenía 10E6 partículas de fago por ml. Las dos placas se incubaron a 37°C durante dos días, y el pH de cada pocillo se registró cada 12 minutos. Todos los mutantes fueron resistentes a fagos comparados con la cepa madre CHCC110019, que fue atacada por el fago CHPC658.

45 Se eligieron doce mutantes basado en el perfil de acidificación en MRS y leche (similar a la cepa madre) y la viscosidad de las cepas.

Análisis de mutantes resistentes a fagos CHCC10019 para propiedades de textura en leche fermentada

50 Después de incubar los doce mutantes y la cepa madre CHCC10019 durante la noche en leche a 37°C, la leche fermentada se llevó a 13°C y se agitó suavemente por medio de una varilla equipada con un disco perforado hasta 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.

55 La prueba de viscosimetría se hizo con tasas de cizalla que variaban desde 0,27 a 300 1/s en 21 etapas. Las tasas de cizalla se aumentaron y después disminuyeron y se registraron las curvas ascendentes y descendentes de tensión de corte y viscosidad aparente. Los tiempos de retraso e integración fueron 5 s y 10 s, respectivamente. Para análisis adicional, se eligió tensión de corte a 300 s-1.

60 Los resultados de las medidas de reología mostraron que todos los doce mutantes (tal como CHCC12813 y CHCC12841) tenían una viscosidad mejorada, medida como tensión de corte, comparado con CHCC10019. El

mayor valor de tensión de corte se obtuvo para CHCC12841 (74,0 Pa) mientras que CHCC10019 tuvo un valor de tensión de corte de 58,0 Pa, véase la figura 2. En la figura, se muestran los datos de reología para los doce mutantes resistentes a fagos. Todos los mutantes tienen un aumento en la tensión de corte que varía del 10% hasta el 28% comparado con CHCC10019.

5 Basado en la actividad de acidificación y los datos de reología cuando los mutantes se hicieron crecer en cocultivo con otras cepas CHCC12813 se seleccionó como el candidato más prometedor de los mutantes aislados para pruebas de aplicación adicionales.

10 Este experimento demuestra que el parámetro reológico importante tensión de corte de una cepa bacteriana mejorará significativamente aislando mutantes resistentes a fagos de la cepa.

**Ejemplo 3: Aislamiento de mutantes resistentes a fago de la cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC9204**

15 De la cepa madre CHCC9204, registrada en la colección de cultivos de Chr. Hansen, se aisló un mutante resistente a fagos. El mutante se aisló en placas de M17-lactosa al 2% agar con MgCl<sub>2</sub>/CaCl<sub>2</sub> 10 mM después de sembrar 0,1 ml de un cultivo nocturno en M17 lactosa de CHCC9204 junto con 0,1 ml del fago CHPC1057 que contenía 1x10<sup>exp09</sup> partículas de fago por ml e incubación durante la noche a 37°C.

20 Entre varios mutantes una cepa, llamada CHCC12339, se purificó por colonia tres veces y se volvió a ensayar en ensayo de placa en placas de M17 lactosa agar a 37°C usando el fago CHPC1057 para exposición a fago, y se confirmó la resistencia a fago (no se observó ninguna placa en el ensayo de placas). CHCC12339 también se probó en leche mostrando una actividad de acidificación comparable a la cepa madre.

25 Análisis de las propiedades de textura del mutante resistente a fagos CHCC12339 en leche fermentada

Después de que el mutante CHCC12339 y la cepa madre CHCC9204 se incubaran durante la noche en leche a 37°C, la leche fermentada se llevó a 13°C y se agitó suavemente por medio de una varilla equipada con un disco perforado hasta 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.

30 La prueba de viscosimetría se hizo con tasas de cizalla que variaban desde 0,27 a 300 1/s en 21 etapas. Las tasas de cizalla se aumentaron y después disminuyeron y se registraron las curvas ascendentes y descendentes de tensión de corte y viscosidad aparente. Los tiempos de retraso e integración fueron 5 s y 10 s, respectivamente. Para análisis adicional, se eligió tensión de corte a 300 s<sup>-1</sup>.

Los resultados de las medidas de reología mostraron que el mutante CHCC12339 produce un aumento en la firmeza de gel (G\*) del 22% comparado con CHCC9204, véase la figura 3. En la figura, se comparan los valores de firmeza de gel (G\*) para el mutante resistente a fago CHCC12339 (78,0 Pa) y la cepa madre CHCC9204 (64,0 Pa).

40 **Ejemplo 4: Aislamiento de mutantes resistentes a fago de la cepa de *Streptococcus thermophilus* CHCC5086**

De la cepa madre CHCC5086, registrada en la colección de cultivos de Chr. Hansen, se aisló un mutante resistente a fagos.

45 El mutante se aisló en placas de M17-lactosa al 2% agar con MgCl<sub>2</sub>/CaCl<sub>2</sub> 10 mM después de sembrar 0,1 ml de un cultivo nocturno en M17 lactosa de CHCC5086 junto con 0,1 ml del fago CHPC1089 que contenía 1x10<sup>exp08</sup> partículas de fago por ml e incubación durante la noche a 37°C.

50 Entre varios mutantes una cepa, llamada CHCC13140, se purificó por colonia tres veces y se volvió a ensayar en ensayo de placa en placas de M17 lactosa agar a 37°C usando el fago CHPC1089 para exposición a fago, y se confirmó la resistencia a fago (no se observó ninguna placa en el ensayo de placa). CHCC13140 también se probó en leche mostrando una actividad de acidificación comparable a la cepa madre.

55 Análisis de las propiedades de textura del mutante resistente a fagos CHCC13140 en leche fermentada

Después de que el mutante CHCC13140 y la cepa madre CHCC5086 se incubaran durante la noche en leche a 37°C, la leche fermentada se llevó a 13°C y se agitó suavemente por medio de una varilla equipada con un disco perforado hasta 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.

60 La prueba de viscosimetría se hizo con tasas de cizalla que variaban desde 0,27 a 300 1/s en 21 etapas. Las tasas de cizalla se aumentaron y después disminuyeron y se registraron las curvas ascendentes y descendentes de tensión de corte y viscosidad aparente. Los tiempos de retraso e integración fueron 5 s y 10 s, respectivamente. Para análisis adicional, se eligió tensión de corte a 300 s<sup>-1</sup>.

65

Los resultados de las medidas de reología mostraron que el mutante CHCC13140 produce un aumento en la tensión de corte del 14% comparado con CHCC5086, véase la figura 4. En la figura, se comparan los datos de tensión de corte para el mutante resistente a fago CHCC13140 (tensión de corte 33,0 Pa) y la cepa madre CHCC5086 (28,0 Pa).

5

**Ejemplo 5: Preparación de un mutante positivo para galactosa de una cepa de *Streptococcus***

Método general para obtener cepas gal+

10 Antes del aislamiento del mutante la cepa madre (por ejemplo, CHCC6008) se sembró en estrías en placas de M17 agar con galactosa al 2% (placas M17-gal). CHCC6008 no creció en galactosa como única fuente de hidratos de carbono, y por tanto se considera que la cepa madre es gal-.

15 Cultivos nocturnos de la cepa madre se sembraron después en placas M17-gal y se pudieron aislar varias colonias después de dos días de crecimiento a 37°C.

Se purificaron varios mutantes en placas de M17-gal y se volvieron a ensayar en caldo M17 que contenía galactosa al 2% como único hidrato de carbono.

20 Se puede obtener un mutante por medio de, por ejemplo, ingeniería genética, radiación y/o tratamiento químico, o el mutante puede ser un mutante espontáneo.

25 Un mutante se consideró positivo para galactosa cuando el pH se redujo en un valor de al menos 1,0 después de 16 horas de incubación a 37 grados C en M17 con galactosa al 2% (galactosa añadida como único hidrato de carbono), inoculado en una cantidad de al menos 10E4 células por ml de medio.

30 Mientras que CHCC6008 no disminuyó el pH en caldo M17-gal significativamente, CHCC11342, uno de los mutantes purificados, alcanzó un pH de 5,4 después de 16 horas a 37°C y, por tanto, se consideró un mutante que fermenta galactosa (gal+) de CHCC6008.

Aislamiento de cepas que fermentan galactosa

35 Se aislaron mutantes como mutante que fermentan galactosa de la cepa de *S. thermophilus* CHCC6008 (=ST6008, DSM18111). Las células CHCC6008 ni se mutagenizaron con ningún compuesto mutagénico ni por luz UV antes de la etapa de aislamiento del mutante. Las cepas aisladas se parecen, por tanto, a mutantes espontáneos positivos para galactosa de CHCC6008.

40 Antes del aislamiento del mutante CHCC6008 se sembró en estrías en placas de M17 agar con galactosa al 2% (placas de M17-gal). CHCC6008 no creció en galactosa como única fuente de hidratos de carbono.

Cultivos nocturnos de CHCC6008 se sembraron después en placas M17-gal y se pudieron aislar varias colonias después de dos días de crecimiento a 37°C. Se purificaron varios mutantes en placas de M17-gal y se volvieron a ensayar en caldo M17 que contenía galactosa al 2% como único hidrato de carbono.

45 Mientras que CHCC6008 no disminuyó el pH en caldo M17-gal significativamente, CHCC11379, uno de los mutantes purificados, alcanzó un pH de 5,3 después de 10 horas a 37°C y, por tanto, se consideró un mutante que fermenta galactosa de CHCC6008.

50 Las cepas CHCC11342 y CHCC11976 se aislaron de la misma manera.

Aislamiento de mutantes por ingeniería genética

Los mutantes positivos para galactosa también se pueden generar por mutagénesis dirigida.

55 Se usan oligonucleótidos que llevan el nucleótido mutado en la caja del promotor -10 de galK para amplificar un fragmento de ADN específico por PCR. El fragmento de PCR que tiene la mutación deseada se clona en un plásmido vector y se transforma en la cepa diana de *S. thermophilus*, y la mutación se integra en el cromosoma e intercambiando la región de promotor de galK de tipo salvaje por recombinación. El aislamiento de cepas se hace como anteriormente.

60

Análisis de textura en leche fermentada

65 El día después de la incubación, la leche fermentada se llevó a 13°C y se agitó suavemente por medio de una varilla equipada con un disco perforado hasta 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.



Los depósitos se han hecho bajo las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de Procedimientos de Patentes.

**Referencias**

5 Appl. Environ. Microbiol. 71, 7, p. 3659-67 (2005);  
 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)  
 10 WO2008/040734A1, WO2007/025097A2, US724161062, WO2007/144770A2, WO2004/085607A,  
 WO2008/148561A, WO11000879A, WO11000883A, WO10023178A

**Lista de secuencias**

- 15 <110> Chr. Hansen A/S  
 <120> Bacteria  
 <130> P3968PC00  
 20 <160> 10  
 <170> PatentIn versión 3.3  
 25 <210> 1  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Streptococcus thermophilus  
 30 <400> 1  
 aaaatattga ttttccatgt gaaaggggtt acgatttaag tataaacaaa aagaataagt 60  
 gagatacatc 70  
 <210> 2  
 <211> 70  
 35 <212> ADN  
 <213> Streptococcus thermophilus  
 <400> 2  
 aaaatattga ttttccatgt gaaaggggtt acgatttcag tataaacaaa aagaataagt 60  
 gagatacatc 70  
 40 <210> 3  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Streptococcus thermophilus  
 45 <400> 3  
 aaaatattga ttttccatgt gaaaggggtt acgatttcag tataaacaaa aagaataagt 60  
 gagatacatc 70  
 <210> 4  
 50 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Streptococcus thermophilus  
 <400> 4  
 aaaatattga ttttccatgt gaaaggggtt acgatttcag tataaacaaa aagaataagt 60  
 55 gagatacatc 70

ES 2 672 900 T3

	<210> 5		
	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Streptococcus thermophilus		
5	<400> 5		
	<b>aaaatattga ttttccatgt gaaaggggtt atgatttcag tataaacaaa aagaataagt</b>		<b>60</b>
	<b>gagatacatc</b>		<b>70</b>
	<210> 6		
10	<211> 6		
	<212> ADN		
	<213> Streptococcus thermophilus		
	<400> 6		
15	<b>ttcagt</b>		<b>6</b>
	<210> 7		
	<211> 6		
	<212> ADN		
20	<213> Streptococcus thermophilus		
	<400> 7		
	<b>tacgat</b>		<b>6</b>
25	<210> 8		
	<211> 6		
	<212> ADN		
	<213> Streptococcus thermophilus		
30	<400> 8		
	<b>tatgat</b>		<b>6</b>
	<210> 9		
	<211> 6		
35	<212> ADN		
	<213> Streptococcus thermophilus		
	<400> 9		
	<b>tattat</b>		<b>6</b>
40	<210> 10		
	<211> 6		
	<212> ADN		
	<213> Streptococcus thermophilus		
45	<400> 10		
	<b>tactat</b>		<b>6</b>

## REIVINDICACIONES

1. Un método para fabricar una bacteria de ácido láctico que genera mayor tensión de corte y/o firmeza de gel que la cepa madre cuando las bacterias se usan para fermentar leche, que comprende las etapas de:
- 5
- proporcionar una cepa bacteriana de ácido láctico como cepa madre;
  - exponer la cepa madre a un bacteriófago que es capaz de lisar la cepa madre;
  - aislar una cepa mutante de la cepa madre, cepa mutante que no es lisada por el bacteriófago;
  - 10 introducir una mutación en la secuencia reguladora de galk de la cepa antes, durante y/o después de la etapa b);
- en donde dicha cepa mutante genera mayor tensión de corte y/o firmeza de gel que la cepa madre cuando se usa para fermentar leche.
- 15
2. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa b) comprende exponer la cepa madre a un bacteriófago seleccionado del grupo que consiste en CHPC658 que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH con el número de acceso DSM23961, CHPC1057 que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH con el número de acceso DSM23962, CHPC1089 que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH con el número de acceso DSM 24022 y CHPC1152 que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH con el número de acceso DSM23994.
- 20
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde dicha mutación en la secuencia reguladora de galk de la cepa se introduce por tratamiento químico o tratamiento de radiación, o por medio de técnicas de ingeniería genética.
- 25
4. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde la mutación se introduce en la región promotora del gen galk.
- 30
5. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde la mutación se introduce en la región -10 también conocida como la caja de Pribnow, o en la región entre la caja de Pribnow y el sitio de unión al ribosoma, del gen galk.
- 35
6. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde la mutación se introduce por técnicas de ingeniería genética y produce:
- la sustitución de uno o más nucleótidos en la región entre la caja de Pribnow y el sitio de unión al ribosoma del gen galk, tal como la sustitución de C en la secuencia TTCAGT (SEQ ID NO: 6) después de la caja de Pribnow de tipo salvaje con un nucleótido seleccionado del grupo que consiste en A, T y G; y/o
  - 40 - la sustitución de una o ambas de C y G en la región -10 de tipo salvaje que tiene la secuencia de nucleótidos TACGAT (SEQ ID NO: 7) con un nucleótido seleccionado independientemente del grupo que consiste en A y T; y/o
  - la sustitución de C de la región -10 de tipo salvaje que tiene la secuencia de nucleótidos TACGAT (SEQ ID NO: 7) con un nucleótido seleccionado independientemente del grupo que consiste en A y T; y/o
  - 45 - la sustitución de C de la región -10 de tipo salvaje que tiene la secuencia de nucleótidos TACGAT (SEQ ID NO: 7) con T; y/o
  - una región -10 que tiene la secuencia de nucleótidos TATGAT (SEQ ID NO: 8), TATTAT (SEQ ID NO: 9) o TACTAT (SEQ ID NO: 10).
- 50
7. El método de cualquier reivindicación precedente, que comprende la etapa adicional de cribar para una cepa mutante que tenga fenotipo Gal+, tal como actividad de degradación de galactosa aumentada comparada con la cepa madre.
- 55
8. Una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Streptococcus thermophilus*, seleccionada del grupo que consiste en: CHCC11977 que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH con el número de acceso DSM22935, CHCC12339 que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH con el número de acceso DSM24090, y CHCC13140 que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH con el número de acceso DSM 24023.
- 60
9. Una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, seleccionada del grupo que consiste en CHCC12813 que se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH con el número de acceso DSM24074.
- 65
10. Una composición que comprende una cepa bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 8-9.

11. Un método para producir un producto de leche fermentada, que comprende fermentar un sustrato de leche con una cepa bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 8-9, o una composición de la reivindicación 10.

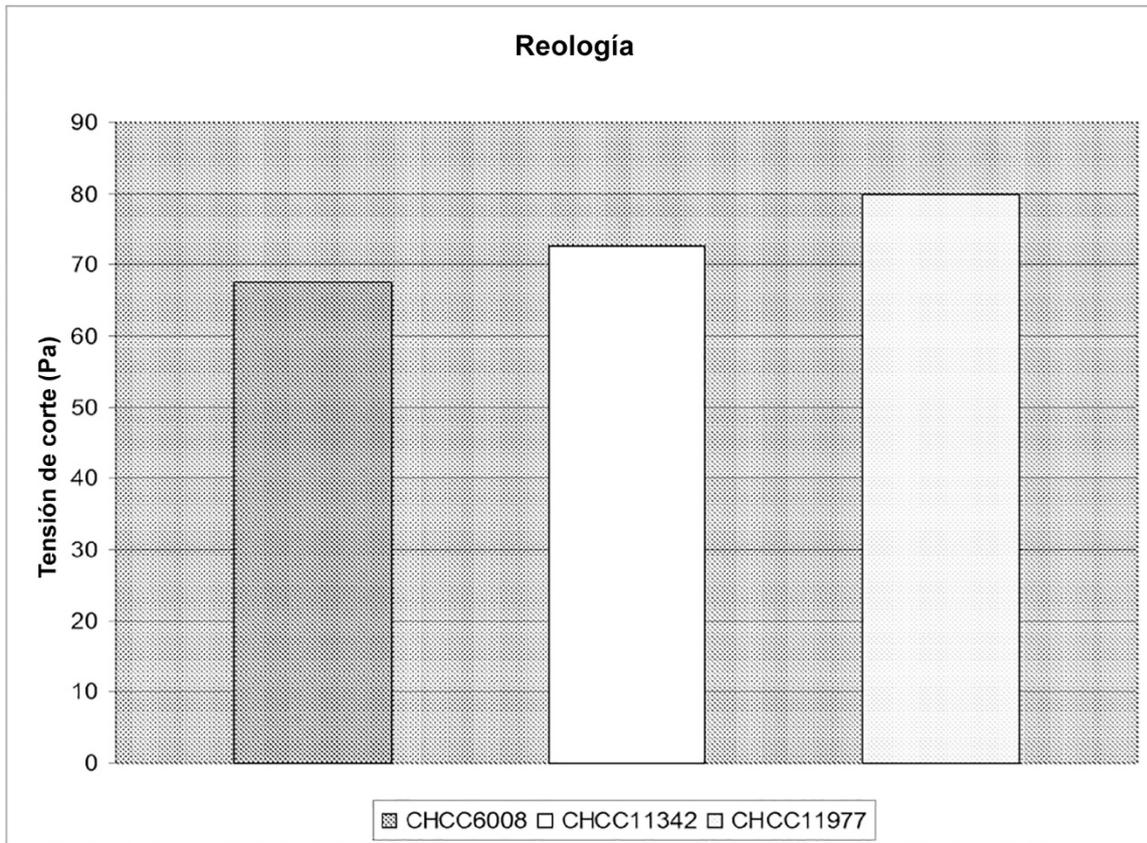


Fig. 1

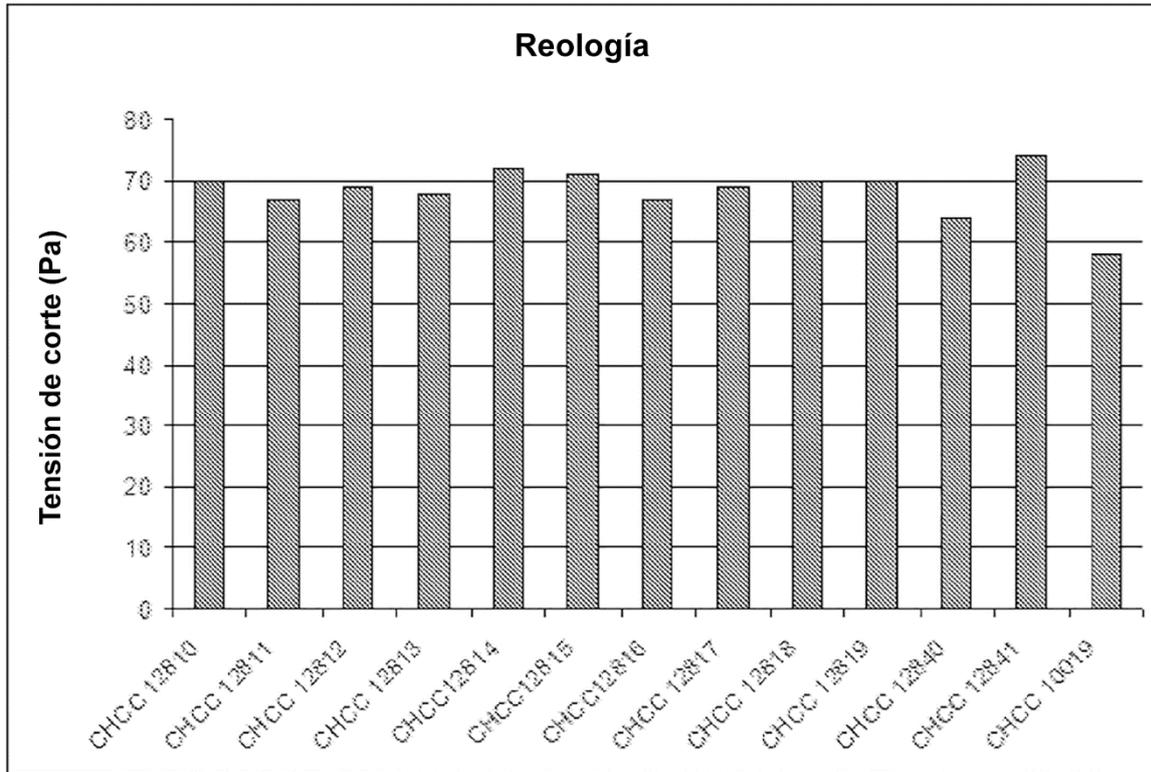


Fig. 2

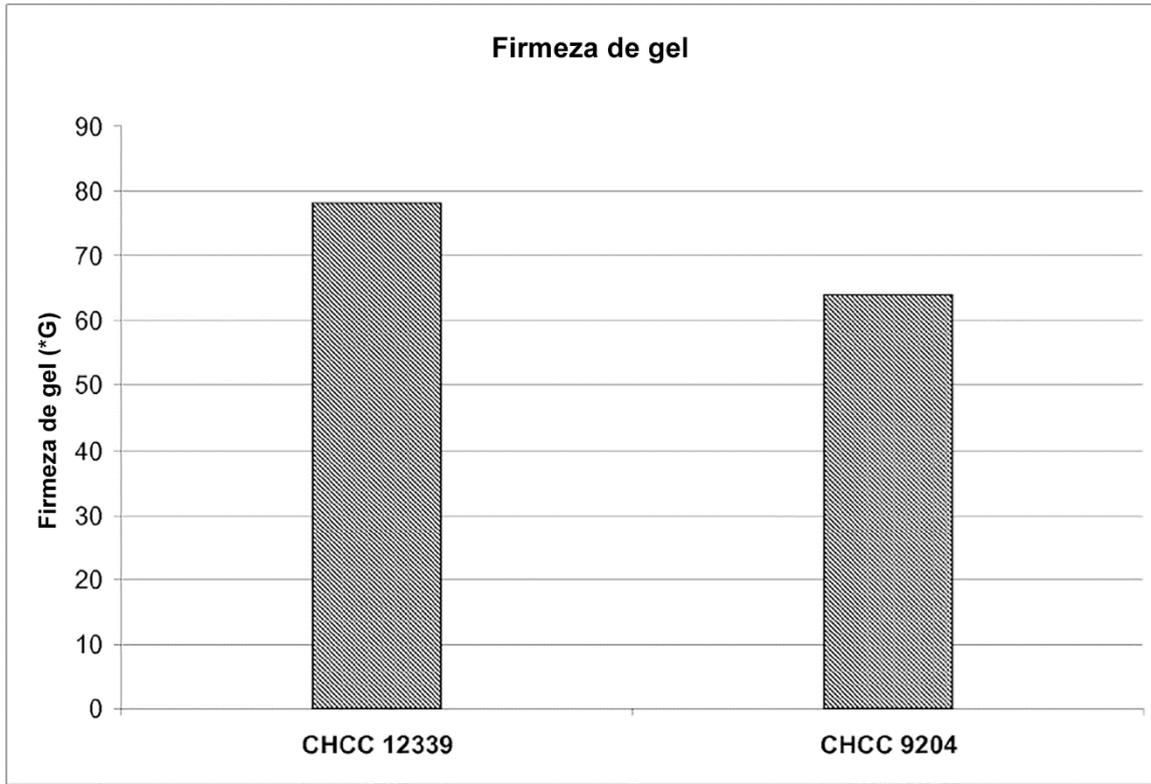


Fig. 3

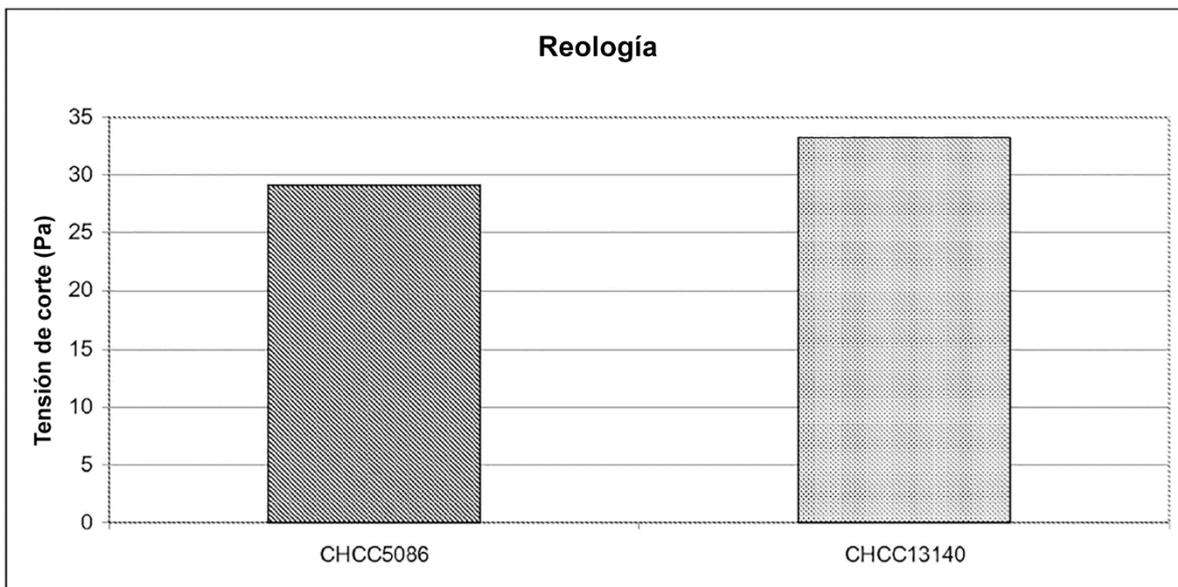


Fig. 4