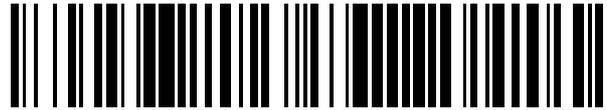


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 367**

51 Int. Cl.:

**A23C 9/12** (2006.01)

**A23C 9/123** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2014 PCT/EP2014/066502**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.02.2015 WO15014940**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2014 E 14747612 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 3027035**

54 Título: **Cepas de bacterias de ácido láctico secretoras de glucosa**

30 Prioridad:

**31.07.2013 NO 20131054**

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

**10.07.2018**

73 Titular/es:

**TINE SA (100.0%)  
P.O Box 25  
0051 Oslo, NO**

72 Inventor/es:

**KLINKENBERG, GEIR;  
HOLO, HELGE y  
ØYAAS, JORUN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 675 367 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**

Cepas de bacterias de ácido láctico secretoras de glucosa

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método de obtención de cepas de bacterias de ácido láctico secretoras de glucosa útiles para la preparación de productos lácteos fermentados, tales como por ejemplo, yogur y cepas de bacterias de ácido láctico obtenidas por dicho método.

Antecedentes de la invención

10 El azúcar se convirtió en el principal edulcorante en Europa y América del Norte en el siglo XVII junto con la creciente producción de azúcar en Brasil y las colonias de las Indias Occidentales, lo que resultó en que el azúcar ya no era un producto de lujo solo para la población próspera. Desde entonces, y junto con la industrialización y la mayor provisión de alimentos procesados industriales y varias bebidas endulzadas, el consumo de azúcar ha aumentado constantemente en la población.

15 Con el consumo creciente de azúcar, ha surgido una mayor conciencia de los posibles efectos adversos con las autoridades de salud y nutrición, por ejemplo, con respecto al riesgo esperado de desarrollar diabetes y obesidad en la población. El efecto negativo esperado de una dieta alta en azúcares en la población resulta en que las autoridades de salud y nutrición pretenden reducir el consumo de azúcar y demanda para el desarrollo de nuevos productos alimenticios con menos azúcar añadido.

20 Diversas bacterias se usan comúnmente en la industria alimentaria, por ejemplo, con el fin de mejorar el sabor, la textura y/o la vida útil de los productos. Dentro de la industria láctea, se han usado diversas bacterias de ácido láctico como "cultivos iniciadores" en la fermentación láctea, por ejemplo, en la fabricación de yogur, queso y productos lácteos fermentados. Los cultivos iniciadores se añaden a la leche que se va a fermentar y se dejan crecer en condiciones controladas, lo que da como resultado la producción de ácido láctico y la modificación del sabor y la textura del producto fermentado.

25 El yogur, así como otros productos lácteos fermentados en el mercado, contiene azúcar añadido para proporcionar el sabor dulce deseado requerido por los consumidores. La cantidad de azúcar añadida varía según la adición de otros ingredientes, tales como por ejemplo, el tipo y la cantidad de frutas y/o bayas. La adición de otros edulcorantes (artificiales) puede reemplazar al azúcar añadido, pero generalmente da como resultado un producto menos atractivo desde el punto de vista del consumidor debido a la creciente demanda de productos alimenticios que no contengan aditivos artificiales.

30 Las bacterias de ácido láctico usadas en la producción de productos lácteos fermentados crecen sobre la lactosa presente en la leche. En *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, la lactosa es absorbida por un transportador de lactosa, luego se divide en glucosa y galactosa y esta última es secretada por el transportador de lactosa en intercambio con la lactosa entrante.

35 Una cantidad insignificante de lactosa también se transforma en diversos otros polisacáridos y compuestos aromáticos que, no obstante, son importantes para obtener el sabor y la textura deseados del producto fermentado.

40 Las bacterias de ácido láctico usadas en la fabricación de productos lácteos fermentados disponibles en los mercados metabolizan solamente la lactosa necesaria para su crecimiento de los microorganismos usados hasta que se alcanza un pH de aproximadamente 4.5. En general, la leche comprende aproximadamente 48 g/l de lactosa antes de la fermentación. Sin embargo, dado que las bacterias de ácido láctico solo metabolizan la cantidad de lactosa necesaria para el autoconsumo, lejos de toda la lactosa presente en la leche se metaboliza por las bacterias de ácido láctico conocidas en la técnica anterior. Por ejemplo, cuando se fermenta leche en la producción de yogur, las bacterias del ácido láctico metabolizan aproximadamente el 16% de la lactosa disponible en la leche. La lactosa restante no está escindida.

45 Como el dulzor de la lactosa es menor en comparación con el dulzor de la galactosa, y de gran importancia, la glucosa, la lactosa que queda en la leche fermentada al final del proceso de fermentación constituye una fuente de dulzura sin explotar.

50 De aproximadamente 48 g/l de lactosa contenida en la leche antes del proceso de fermentación, aproximadamente 8 g/l de lactosa se metabolizan al máximo en ácido láctico hasta que el proceso de fermentación finaliza cuando se alcanza un pH de aproximadamente 4.5. La cantidad de galactosa disponible es, por lo tanto, como máximo de aproximadamente 4.0 g/l. De este modo, si se acumula toda la galactosa producida por la escisión de la lactosa 8 g/l, esto solo daría como resultado una reducción insignificante de la adición de azúcar necesaria para obtener un producto fermentado con un dulzor aceptable.

Además, aunque toda la galactosa disponible en la lactosa en la leche se libera mediante escisión de esencialmente toda la lactosa, el aumento en el dulzor debido a la secreción incrementada de galactosa no solo resultaría en una reducción sustancial en la necesidad de más azúcar.

5 Sin embargo, en caso de que se puede utilizar el potencial de sabor dulce de la glucosa inherente en la lactosa de leche sin explotar, por ejemplo, al proporcionar bacterias de ácido láctico con aumento de la hidrólisis de lactosa y las características de secreción de glucosa, se pueden obtener productos lácteos fermentados con una necesidad significativamente menor de azúcar añadido.

10 Pool et al usaron ingeniería genética en la construcción de un mutante de *Lactococcus lactis* incapaz de degradar la glucosa y que secretó glucosa cuando creció en lactosa (Pool et al., 2006, " Natural sweetening of food products by engineering *Lactococcus lactis* for glucose production", *Metab Eng* 8:456-464.). La cantidad de azúcares en los sobrenadantes del mutante de *L. lactis* se determinó por HPLC.

15 Van den Bogaard et al., Publicado en *Journal of Bacteriology*, 2000, vol. 182, No. 21, págs. 5982-5989 sobre una disrupción de *ccpA* de la cepa de *Streptococcus thermophilus* encontrada que libera glucosa en el medio cuando crecía en lactosa. Sin embargo, los efectos primarios de la interrupción de *ccpA* fueron el tiempo prolongado de retraso y la tasa de crecimiento reducida en todos los azúcares probados.

20 Ibrahim and O'Sullivan informan el uso de mutagénesis química para el aislamiento de mutantes superproductores de food-galactosidasa de calidad alimentaria de *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* y *Streptococcus thermophilus*, identificados mediante el ensayo de o-nitrofenil- $\beta$ -galactosidasa (Ibrahim and O'Sullivan, 2000, "Use of chemical mutagenesis for the isolation of food grade beta-galactosidase overproducing mutants of *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* and *Streptococcus thermophilus*", *Jour. Dairy Sci.*, 83, pp. 923-930). El objetivo del protocolo informado en este documento es proporcionar cultivos probióticos con concentraciones de  $\beta$ -galactosidasa incrementadas útiles en el tratamiento de los síntomas de malabsorción de lactosa en humanos.

25 Thompson et al., 1985, 162: 1, 217-223 se refiere a una cepa 133 *Streptococcus lactis* que carece de actividades de glucoquinasa y manosa fosfotransferasa. El doble mutante *S. lactis* 133 manosa-PTSd GK- descrito en ese documento no puede utilizar glucosa suministrada exógenamente o generada intracelularmente para su crecimiento.

El documento US 5,071,763 describe la provisión de un mutante de cepa de *S. thermophiles* que tiene un sistema defectuoso de transporte de lactosa que se dice que es útil en la preparación de alimentos lácteos reducidos en lactosa o sin lactosa.

30 Se conocen diversos métodos para el cribado de microorganismos, también métodos que proporcionan el cultivo automatizado y el cribado de microorganismos que implican varias funciones y tareas diferentes y repetitivas, tales como por ejemplo, instalaciones de cultivo para las cepas que se van a cribar, inoculación de cultivo líquido, centrifugación, pipeteo, dilución, transferencia de muestras, instalaciones de ensayo y operaciones, y hardware, robots y computadoras apropiados que permitan la entrega y manipulación de un gran número de muestras en el mismo tiempo. Tales sistemas proporcionan un cribado de alto rendimiento de numerosos aislados de microorganismos, por ejemplo, usando placas de microtitulación adaptadas para el cribado de 6 a más de 1500 muestras de microorganismos al mismo tiempo (por ejemplo, la plataforma de cribado de Rendimiento Ultra Alto GigaMatrix®).

35 El documento WO 01/32844 describe un ensayo de cribado de alto rendimiento basado en una placa de microtitulación para el cribado de un gran número de poblaciones celulares que producen variantes de una molécula de interés, tal como por ejemplo,  $\alpha$ -amilasa, y en el que las muestras de los pocillos de la placa de microtitulación se analizan, por ejemplo, por detección de, por ejemplo, fluorescencia, luminiscencia, actividad enzimática, etc.

40 Aunque están disponibles diversos sistemas automatizados de criba de microorganismos, el uso de los mismos depende de si están disponibles ensayos para analizar las características deseadas del microorganismo ensayado, y también si dichos ensayos son fácilmente automatizados y apropiados para sistemas de cribado a gran escala. Los métodos comúnmente usados para detectar y cribar bacterias de ácido láctico útiles en la industria láctea en la actualidad, según nuestro conocimiento, se basan esencialmente en métodos dependientes del uso de HPLC o basándose en la medición de la actividad de una enzima particular de interés, tal como la actividad de lactasa o glucoquinasa, tasa de crecimiento, etc. Desde un punto de vista industrial, el uso de HPLC para determinar la capacidad de una bacteria de ácido láctico de metabolizar un nutriente o de producir un metabolito deseado es no es deseable ya que consume tiempo y es ineficiente. Aunque se ha descrito el uso de diversos métodos enzimáticos para determinar la glucosa en una muestra de un cultivo de bacterias de ácido láctico, cf. Por ejemplo, Thomson et al. arriba, tales métodos no se han utilizado hasta ahora en los métodos de cribado a gran escala. Además, como se muestra a continuación (ejemplo 3), se descubrió que el cribado de alto rendimiento basado en un ensayo de actividad enzimática bien conocido era inexacto e ineficaz.

55 Los productos lácteos fermentados con menos o sin azúcar añadida pueden ser proporcionados por el uso de una cepa de bacteria de ácido láctico que tiene la capacidad de hidrolizar más de la lactosa presente en la leche sin explotar y de secretar la glucosa resultante en el producto fermentado. Con el fin de seleccionar de forma eficaz mutantes de

bacterias de ácido láctico secretoras de glucosa, existe, sin embargo, la necesidad de desarrollar métodos que permitan la identificación de tales mutantes que no dependan de un ensayo engorroso y que consume mucho tiempo. De este modo, es un objeto de la presente invención proporcionar métodos de cribado automatizados eficientes para identificar bacterias de ácido láctico con la capacidad de secretar glucosa.

5 Resumen de la invención.

El objeto de la presente invención se obtiene mediante la provisión de una mutagénesis y un método de cribado a gran escala donde la identificación de mutantes secretores de glucosa se realiza usando un ensayo enzimático. Más particularmente, el método de cribado a gran escala de la presente invención comprende las etapas de:

10 i) someter bacterias de ácido láctico a condiciones de mutagénesis, en el que la condición de mutagénesis consiste en la exposición de bacterias del ácido láctico a cualquier mutágeno convencional de origen físico (por ejemplo, radiación X, radiación UV) o químico (por ejemplo, mutágenos); ii) selección de las colonias obtenidas en la etapa

i) por separado y transfiere dichas colonias para su crecimiento en una matriz en medios de crecimiento que comprenden lactosa como única fuente de hidratos de carbono;

15 iii) ensayar la cantidad de glucosa presente en el sobrenadante del cultivo después del crecimiento de la etapa ii) mediante el uso de:

a) glucosa oxidasa; peroxidasa; y sustrato de señal de peroxidasa; o

b) glucoquinasa, hexoquinasa y glucosa-6- fosfato deshidrogenasa, ATP y NAD o NADP; o:

20 c) glucosa deshidrogenasa y un aceptor de electrones; en el que la cantidad de glucosa secretada en el medio de cultivo es proporcional a la cantidad de sustancia señal obtenida por la transformación del sustrato de señal de peroxidasa en a) o la cantidad de NADH o NADPH producida en b), o la cantidad de aceptor de electrones reducido en c).

25 A pesar del hecho de que la técnica anterior muestra que la manipulación del transporte y metabolismo de lactosa y glucosa de bacterias de ácido láctico puede dar como resultado efectos negativos (tales como, por ejemplo, características de crecimiento pobres), los presentes inventores proporcionan una cepa de bacteria de ácido láctico que tiene capacidad para absorber y escindir más lactosa que la necesaria para su crecimiento de las bacterias, y que además secretan más glucosa en los medios de fermentación en comparación con la cepa de tipo silvestre correspondiente. De acuerdo con una realización, las cepas de ácido láctico sometidas al método de la presente invención se someten a sonicación después y opcionalmente antes de la etapa i).

30 De acuerdo con otra realización del presente método, las colonias obtenidas en la etapa i) se seleccionan por separado y se transfieren para su crecimiento en un medio que comprende lactosa como única fuente de carbohidratos en una matriz.

35 Según otra realización más, la cepa de ácido láctico parenteral se selecciona del grupo que consiste en cepas de *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.* (por ejemplo, *Streptococcus thermophilus*), *Lactobacillus spp.* (por ejemplo, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus subsp. casei*), *Leuconostoc spp.*, *Pseudoleuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*, y *Bifidobacterium spp.*, preferiblemente *S. thermophilus*.

Según otra realización más de la presente invención, la condición de mutagénesis en la etapa ii) consiste en cultivar las bacterias de ácido láctico en presencia de un mutágeno, tal como por ejemplo, un mutágeno seleccionado del grupo que consiste en n-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG) y etano metanosulfonato (EMS).

40 Según una realización adicional del presente método, el cribado de la etapa (iv) se realiza usando glucosa oxidasa, peroxidasa y un sustrato de señal de peroxidasa. El dicho sustrato de peroxidasa se puede seleccionar según una realización del grupo que consiste en 4-amino-antipireno, 4-amino-antipirina, 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), odianisidina, o-fenilendiamina (OPD) y 4- (2-piridilazo) resorcinol, N-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (Amplex Red), preferiblemente 4-amino-antipirina.

45 Según otra realización más de la presente invención, la cantidad de sustancia de señal o NAHD o NADPH o aceptor de electrones reducido formado en iv) se mide fotométricamente, por ejemplo, medido por espectrofotometría, luminiscencia o fluorescencia.

De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se proporciona un método de cribado a gran escala para identificar una cepa de *S. thermophiles* secretora de glucosa, en el que el proceso comprende las etapas de:

i) someter las bacterias *S. thermophiles* a condiciones de mutagénesis, en las que la condición de mutagénesis consiste en la exposición de bacterias de ácido láctico a cualquier mutágeno convencional de origen físico (por ejemplo, radiación X, radiación UV) o químico (por ejemplo, mutágenos);

5 ii) seleccionar las colonias obtenidas en la etapa i) por separado y transferir dichas colonias para su crecimiento en una matriz en medios de crecimiento que comprenden lactosa como única fuente de hidratos de carbono;

iii) ensayar la cantidad de glucosa presente en los sobrenadantes de cultivo después del crecimiento de la etapa iii) mediante el uso de glucosa oxidasa; peroxidasa; y un sustrato de señal de peroxidasa;

en el que la cantidad de glucosa secretada en el medio de cultivo es proporcional a la cantidad de sustancia señal obtenida por la transformación del sustrato de señal de peroxidasa en iii).

10 De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se proporciona una cepa bacteriana secretora de glucosa, en la que dicha cepa se selecciona del grupo que consiste en:

15 a) la cepa de ácido láctico 2-83 depositada en virtud del Tratado de Budapest en DSMZ con número de acceso DSM 27535 o la cepa de ácido láctico 10.44 depositada en virtud del Tratado de Budapest en DSMZ con número de acceso DSM 29077, y cepas relacionadas que tienen sustancialmente las mismas características genotípicas y fenotípicas con respecto al transporte de lactosa, hidrólisis de lactosa y/o secreción de glucosa; y

b) una cepa de bacterias de ácido láctico que es un mutante de la cepa de a), que tiene la capacidad de secretar al menos 8 g/l de glucosa en el producto fermentado.

De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se proporciona una cepa de bacteria de ácido láctico secretora de glucosa, en el que dicha cepa se selecciona del grupo que consiste en:

20 a) la cepa de ácido láctico 2-83 depositada en virtud del Tratado de Budapest en DSMZ con número de acceso DSM 27535 o la cepa de ácido láctico 10.44 depositada en virtud del Tratado de Budapest en DSMZ con número de acceso DSM 29077, y cepas relacionadas que tienen sustancialmente las mismas características genotípicas y fenotípicas con respecto al transporte de lactosa, hidrólisis de lactosa y/o secreción de glucosa; y

25 b) una cepa de bacteria de ácido láctico que es un mutante de la cepa de a), que tiene la capacidad de secretar al menos 9 g/l de glucosa en el producto fermentado.

De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se proporciona una cepa bacteriana secretora de glucosa, en la que dicha cepa se selecciona del grupo que consiste en:

30 a) la cepa de ácido láctico 2-83 depositada en virtud del Tratado de Budapest en DSMZ con número de acceso DSM 27535 o la cepa de ácido láctico 10.44 depositada en virtud del Tratado de Budapest en DSMZ con número de acceso DSM 29077, y cepas relacionadas que tienen sustancialmente las mismas características genotípicas y fenotípicas con respecto al transporte de lactosa, hidrólisis de lactosa y/o secreción de glucosa; y

b) una cepa de bacterias de ácido láctico que es un mutante de la cepa de a), que tiene la capacidad de secretar al menos 8 g/l de glucosa en el producto fermentado.

35 La presente invención proporciona específicamente cepas de *S. thermophilus* depositadas en DSMZ (Instituto Leibniz DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) con los números de acceso DSM 27535 y DSM 29077, respectivamente, y también cepas de bacterias de ácido láctico secretoras de glucosa obtenidas por el método según la presente invención.

40 La presente cepa de bacteria de ácido láctico según la presente invención se puede usar en la fabricación de un producto de leche fermentada. La presente invención proporciona de este modo diversos productos lácteos fermentados que comprenden una cepa bacteriana secretora de glucosa identificada por el método según la presente invención.

Finalmente, una realización adicional de la presente invención es el uso de glucosa oxidasa, peroxidasa, glucoquinasa, hexoquinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y glucosa deshidrogenasa en un método de cribado de alto rendimiento para la identificación de bacterias de ácido láctico secretoras de glucosa.

Breve descripción de las figuras

45 Figura 1: muestra la curva de crecimiento de una cepa de *S. thermophilus* aislada del cultivo comercial disponible YF-L702.

Figura 2: muestra los resultados del ensayo enzimático del sobrenadante de mutantes de una cepa de *S. thermophilus* aislada del cultivo YF-L702 disponible comercialmente. Los cultivos se cribaron en 4 pocillos paralelos, y se calculó la concentración promedio de glucosa. La desviación estándar se da para todas las muestras medidas.

Figura 3: muestra el pH en los cultivos de leche durante la fermentación a 42 °C por *S. thermophilus* y *Lb. delbrückii* subsp. *Bulgaricus*, en el que la línea continua representa cepas mutantes y en el que la línea punteada representa cepas de tipo salvaje.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un método de cribado de alto rendimiento para identificar cepas de bacterias de ácido láctico secretoras de glucosa basándose en los hallazgos de que el nivel de glucosa secretada en el medio de bacterias de ácido láctico sometidas a mutagénesis podría medirse eficaz y automáticamente usando un ensayo basado en enzimas

De acuerdo con la presente invención, la expresión "condiciones de mutagénesis" pretende comprender cualquier método apropiado para la introducción de mutaciones aleatorias en el genoma de uno o más microorganismos, tales como cepa(s) de bacterias de ácido láctico. Por ejemplo, las condiciones de mutagénesis pueden ser la exposición de bacterias de ácido láctico a cualquier mutágeno convencional de origen físico (por ejemplo, radiación X, radiación UV) o químico (por ejemplo, mutágenos).

Se pueden usar numerosos mutágenos químicos según la presente invención, tales como por ejemplo, mutágenos seleccionados del grupo que consiste en n-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG) y etano metanosulfonato (EMS).

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se usa preferiblemente etano metanosulfonato (EMS).

Para proporcionar un método eficiente que permita un cribado de alto rendimiento de bacterias de ácido láctico según la presente invención, es vital que el método de ensayo sea sensible y fiable. Como una mayor capacidad para secretar más glucosa puede deberse a una mayor actividad de lactasa, los presentes inventores midieron la capacidad de secretora de glucosa de cepas mutantes midiendo los efectos del crecimiento de las cepas mutagenizadas en presencia de 5-bromo-4-cloro-indolilo-β-D-galactopiranosido (X-Gal, CAS No. 7240-90-6). X-Gal es un sustrato cromogénico que produce un rico color azul cuando se escinde por lactasa. El color azul formado se puede detectar visualmente sobre el fondo y medirse mediante una espectrofotometría. Otros han cribado previamente cepas de *S. thermophilus* que sobreexpresan lactasa cultivando los mutantes que se van a ensayar en agar que comprende X-gal (Ibrahim and O'Sullivan (2000), supra). Sin embargo, como se ve en el ejemplo 3, este método no era aplicable en un método de cribado de alto rendimiento para la determinación de bacterias de ácido láctico secretoras de glucosa.

Los presentes inventores, por lo tanto, tuvieron que desarrollar otros métodos útiles para el propósito de identificar bacterias de ácido láctico secretoras de glucosa. En lugar de medir la actividad de lactasa de los mutantes obtenidos, los inventores buscaron encontrar un método que permitiera la medición directa de la concentración de glucosa, y sin usar HPLC.

La concentración de glucosa se mide en muestras biológicas, tales como suero, sangre u orina, usando diversos ensayos de glucosa comúnmente disponibles, donde la glucosa contenida en la muestra que se va a analizar se oxida mediante la adición de glucosa oxidasa, dando como resultado la formación de D-glucono-γ-lactona y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se hace reaccionar adicionalmente con un sustrato formador de señal en presencia de aún una segunda enzima, peroxidasa, formando un compuesto señal que se puede medir fotométricamente. El término "analizar la cantidad de glucosa mediante el uso de glucosa oxidasa, peroxidasa y un sustrato de señal de peroxidasa" como se usa en la presente solicitud se refiere al uso de un sistema como se describió anteriormente, en el que la adición de glucosa oxidasa da como resultado la oxidación de glucosa para producir peróxido de hidrógeno y D-glucono-δ-lactona. La producción de peróxido de hidrógeno en este sistema está a su vez involucrada en la transformación de un sustrato formador de señal en un compuesto formador de señal debido a la presencia de la peroxidasa. La cantidad de glucosa presente en el medio de cultivo es, de este modo, proporcional a la cantidad de compuesto señal formado.

Este principio se ha usado, por ejemplo, para analizar microorganismos con actividad aumentada de glucosa oxidasa, véase Fiedurek et al. (1986), *Enzyme Microbiol. Technol.*, vol 8, pp 734 - 736. También se ha utilizado un ensayo de glucosa oxidasa/peroxidasa para detectar glucosa residual en medio de cultivo de bacterias del ácido láctico, esto es, estudiando de este modo el consumo de glucosa en algunas especies de *Lactobacillus* (Montville and Hsu (1987), *Journal of Microbiol. Methods*, 6, pp. 95-98). Montville y Hsu indicaron que los valores anormalmente altos de glucosa en el ensayo de glucosa oxidasa/peroxidasa fueron causados por la presencia de peróxido endógeno, y sugieren la necesidad de preincubación con catalasa.

El uso de glucosa oxidasa, o cualquier otro sistema enzimático útil para medir la cantidad de glucosa en una muestra, no se ha usado previamente en un cribado a gran escala de numerosas bacterias.

Según la presente invención, el cribado de mutantes que tienen la capacidad deseada para secretar glucosa en el producto lácteo que se va a fermentar se proporciona usando un método de cribado automático basado en enzimas que mide directamente la cantidad de glucosa secretada por las cepas analizadas. Se encuentra que el método basado en enzimas es superior en comparación con el ensayo de actividad de lactasa/X-gal. Contrariamente a las enseñanzas de la técnica anterior, el presente inventor además no encontró necesario añadir ninguna catalasa para obtener resultados fiables cuando se criban mutantes de *S. thermophilus* (véase Montville y Hsu, supra).

Otros sistemas enzimáticos también pueden usarse para medir la cantidad de glucosa secretada por bacterias de ácido láctico sometidas al presente método de mutagénesis, por ejemplo, glucoquinasa, hexoquinasa y glucosa-6 fosfato deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, junto con ATP, y NAD o NADP u otros aceptores de electrones apropiados como sustratos, respectivamente.

Si se utiliza hexoquinasa o glucoquinasa para la determinación de la concentración de glucosa, se añade hexocinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, ATP y NAD o NADP a la solución que se espera que comprenda glucosa. La hexoquinasa reacciona con D-glucosa para formar glucosa-6-fosfato en presencia de ATP. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa actúa además sobre la glucosa-6-fosfato obtenida en presencia de NAD o NADP formando NADH o NADPH, respectivamente.

La cantidad de NADH o NADPH se puede medir usando métodos de espectrofotometría bien conocidos. La cantidad de NADPH o NADH es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra.

En aún un método alternativo de cribado basado en enzimas, se puede utilizar glucosa deshidrogenasa, que en presencia de un aceptor de electrones transforma D-glucosa en D-glucono-1,5-lactona y reduce el aceptor de electrones. La cantidad de aceptor de electrones reducido se puede medir entonces mediante cualquier método de espectrofotometría apropiado. Se pueden usar diversos aceptores de electrones útiles, tales como por ejemplo, NAD y NADP.

El presente método proporciona un cribado de alto rendimiento de bacterias de ácido láctico secretoras de glucosa, esto es, donde se pueden realizar la administración de líquido, clones, compuestos o sustratos para añadirse, etc., mediante sistemas automatizados de manipulación de fluidos y robótica. Por ejemplo, las muestras de los cultivos de las cepas de bacterias de ácido láctico mutagenizadas se pueden ensayarse usando un sistema de manipulación automatizado con un robot de manipulación integrado que permite el aislamiento de mutantes y la transferencia de las bacterias de ácido láctico mutagenizadas a placas de microtitulación para su posterior manipulación.

Antes de la selección de los clones que se van a ensayar, la cepa de bacterias de ácido láctico mutagenizadas se transfiere a un medio de crecimiento que comprende lactosa como única fuente de hidratos de carbono. Se usa un exceso de lactosa para imitar las condiciones de crecimiento presentes en la fermentación de la leche.

La selección y el aislamiento por separado de los clones también se pueden realizar usando citómetros de flujo de clasificación celular conocidos para el experto en el arte. Los clones que se van a cribar según la etapa iii) del presente método se pueden seleccionar y transferir a placas de microtitulación mediante el uso de cualquier robot de recogida de colonias apropiado y cultivar. Las muestras de los medios de cultivo obtenidos, opcionalmente los sobrenadantes obtenidos después de la centrifugación de las cepas cultivadas, se someten luego al ensayo enzimático automatizado. Antes y después de que las cepas de ácido láctico se exponen a condiciones de mutagénesis, el cultivo se sonifica preferiblemente para separar las células individuales.

La selección y transferencia de colonias se pueden realizar usando un robot de selección de colonias, tal como un robot Genetix Q-pixII (recolectores de colonias Genetix, Molecular Devices). La manipulación de las cepas cultivadas, y el medio de cultivo de las mismas se puede realizar usando un robot de manejo de líquidos, tal como por ejemplo, Sistema de manejo de líquidos Beckman Coulter con un robot de manejo de líquidos integrado Beckman Coulter NXP (Beckman Coulter, Inc.). También se pueden usar otros sistemas automáticos de manejo de líquidos y robots de recolección de colonias.

Según una realización, se usa un robot de manejo de líquidos para transferir muestras de los sobrenadantes a pocillos de placas de microtitulación apropiadas que comprenden glucosa oxidasa, peroxidasa y un sustrato de formación de señal de peroxidasa. Las enzimas y el sustrato mencionados pueden opcionalmente añadirse a los sobrenadantes. Tras la oxidación de la glucosa presente en los sobrenadantes por la glucosa oxidasa, se produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La peroxidasa cataliza una reacción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el sustrato que forma la señal de peroxidasa dando como resultado la formación de un compuesto señal. La cantidad de compuesto de señal formada es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra. En base a una curva estándar apropiada adaptada a la glucosa/peroxidasa/ sustrato de peroxidasa utilizado, la cantidad de glucosa se determina fotométricamente, por ejemplo, por espectrofotometría, fluorescencia, luminiscencia o cualquier otro método fotométrico apropiado.

Se pueden usar diversos sustratos formadores de señal de peroxidasa según la presente invención, tales como por ejemplo, un sustrato seleccionado del grupo no limitante de 4-amino-antipireno, 4-amino-antipirina, 2,2'-azinobis (ácido

3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), odianisidina, o-fenilendiamina (OPD), 4- (2-piridilazo) resorcinol y N-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (Amplex Red).

5 De acuerdo con una realización de la presente invención, el sustrato de peroxidasa es 4-amino-antipirina. La bacteria del ácido láctico es como se menciona comúnmente en la industria láctea y cubre en general a los organismos que producen ácido láctico como subproducto principal del proceso de fermentación. Las bacterias del ácido láctico se usan en la industria láctea con mayor frecuencia como "cultivos iniciadores", esto es, se añaden a la leche y se cultivan bajo condiciones controladas para producir ácido láctico, reducir el pH y producir el sabor y la textura deseados del producto fermentado.

10 El término "bacterias de ácido láctico" como se usa en el contexto de la presente invención, se debe entender que significa cualquier bacteria de ácido láctico útil en la fabricación de productos lácteos fermentados después de la fermentación de leche que comprende lactosa. Por ejemplo, las bacterias de ácido láctico que se pueden someter al método de la presente invención se pueden seleccionar del grupo no limitante que consiste *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.* (por ejemplo, *Streptococcus thermophilus*), *Lactobacillus spp.* (por ejemplo, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus subsp. casei*), *Leuconostoc spp.*, *Pseudoleuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*, y *Bifidobacterium spp.*

15 Las bacterias de ácido láctico usadas en la industria láctea se suministran y están disponibles comúnmente para la industria láctea como cultivos congelados o liofilizados. Cualquier bacteria de ácido láctico utilizada en procesos de fermentación láctea puede someterse a la mutagénesis y al método de cribado según la presente invención. Diversas bacterias de ácido láctico que se pueden usar según el presente método están disponibles comercialmente, por ejemplo, de DSMZ (Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, <http://www.dsmz.de/>), from the microbiology collection of ATCC ([http://www.lgcstandardsatcc.org/en/Products/Collections/Microbiology\\_Collections.aspx](http://www.lgcstandardsatcc.org/en/Products/Collections/Microbiology_Collections.aspx)), NCIMB (The national collection of Industrial, Marine, and Food Bacteria, <http://www.ncimb.com/culture.html>), o de otros proveedores comerciales, tales como por ejemplo Chr. Hansen AS (<http://www.chr-hansen.com/products/product-areas/dairy-cultures.html>). Además, las cepas de bacterias del ácido láctico también se pueden aislar del yogur, el queso, la leche cultivada y los alimentos fermentados en general.

20 Cualquier bacteria de ácido láctico como se menciona anteriormente se puede someter al método según la presente invención. De acuerdo con una realización, las bacterias de ácido láctico sometidas al método de la invención son *S. thermophilus*.

25 Como se usa en este documento, una "bacteria o bacterias de ácido láctico secretoras de glucosa" o "bacterias mutantes o mutantes de ácido láctico" se refiere a una cepa de bacteria de ácido láctico que tiene la capacidad de hidrolizar sustancialmente una cantidad de lactosa presente en un producto lácteo fermentado, y en el que hay menos necesidad de añadir azúcar en un producto lácteo fermentado producido con la bacteria de ácido láctico secretora de glucosa de la presente invención en comparación con productos similares preparados usando la cepa de tipo original/salvaje.

El presente método además proporciona un método para identificar cepas mutantes de ácido láctico que tienen la capacidad de secretar una cantidad sustancial de glucosa en el producto lácteo fermentado.

Sin estar limitados por la teoría, se cree que la cepa de la bacteria del ácido láctico de la presente invención es capaz de aumentar la absorción de lactosa, aumentar la actividad de lactasa y aumentar la secreción de glucosa.

30 De acuerdo con la presente invención, "una cantidad sustancial de lactosa" se debe entender que significa que la bacteria de ácido láctico de la presente invención es capaz de hidrolizar más lactosa que la correspondiente cepa o cepas de tipo salvaje/original de la misma especie. Por ejemplo, según una realización de la invención, la bacteria de ácido láctico de la presente invención es capaz de hidrolizar al menos aproximadamente 50% de la lactosa presente en la leche que se va a fermentar, tal como al menos aproximadamente 60%, tal como a al menos aproximadamente 70%, tal como al menos aproximadamente 80%, tal como al menos aproximadamente 90%, o tal como al menos aproximadamente 95%. De acuerdo con otra realización de la presente invención, la bacteria de ácido láctico secretora de glucosa de la presente invención es capaz de hidrolizar esencialmente toda la lactosa presente en la leche que se va a fermentar.

35 De acuerdo con la presente invención, se debe entender que "una cantidad sustancial de glucosa significa que la bacteria de ácido láctico secretora de glucosa de la presente invención es capaz de secretar más glucosa en el producto lácteo fermentado que la cepa o cepas de tipo salvaje/original correspondientes de la misma especie que no se someten al método según la presente invención.

40 Por ejemplo, las bacterias de ácido láctico secretoras de glucosa de la presente invención son según una realización capaces de secretar al menos aproximadamente 8 g/l de glucosa en el producto lácteo fermentado, tal como al menos 9 g/l, glucosa 10 g/l de glucosa, tal como al menos aproximadamente 15 g/l de glucosa, tal como al menos 20 g/l de glucosa, tal como al menos aproximadamente 30 g/l de glucosa, tal como al menos aproximadamente 40 g/l de glucosa.

Las bacterias de ácido láctico secretoras de glucosa de la presente invención pueden usarse solas o junto con otras cepas de bacterias de ácido láctico bien conocidas para el experto. Por ejemplo, en el caso de que las bacterias del ácido láctico sean *S. thermophilus*, se pueden usar junto con *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

5 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una cepa bacteriana secretora de glucosa seleccionada del grupo que consiste en:

a) la cepa de ácido láctico 2-83 depositada en virtud del Tratado de Budapest en DSMZ con el número de acceso DSM27535 o la cepa de ácido láctico 10.44 depositada en DSMZ con el número de acceso 29077, y cepas relacionadas que tienen sustancialmente las mismas características genotípicas y fenotípicas con respecto a transporte de lactosa, hidrólisis de lactosa y/o secreción de glucosa; y

10 b) una cepa de bacterias de ácido láctico que es un mutante de la cepa de a), que tiene la capacidad de secretar al menos 8 g/l de glucosa en el producto fermentado.

15 De acuerdo con una realización, la presente invención se refiere a las nuevas cepas secretoras de glucosa 2-83 depositadas en virtud del Tratado de Budapest en DSMZ el 12 de julio de 2013 con el número de acceso DSM27535 y la cepa 10.44 depositada en virtud del Tratado de Budapest en DSMZ el 11 de julio de 2014 con el número de acceso DSM29077, que están ambos aislados según el método de cribado a gran escala de la presente invención.

20 Se debe entender que la presente divulgación cubre cepas bacterianas de ácido láctico que tienen sustancialmente la misma capacidad de secreción de glucosa que las cepas identificadas según la presente invención, tales como por ejemplo, la cepa depositada mencionada anteriormente y, de este modo, que tienen sustancialmente las mismas características genotípicas y fenotípicas con respecto al transporte de lactosa, la hidrólisis de lactosa y la secreción de glucosa. El experto reconocerá que pueden introducirse diversas sustituciones, eliminaciones o adiciones a la secuencia genómica mediante métodos de tecnología de genes comúnmente disponibles o aleatoriamente durante el cultivo de una cepa de bacteria de ácido láctico, y que dicha alteración puede introducirse con propósito o aleatoria/accidentalmente sin que cambien sustancialmente las características de la cepa bacteriana. Se debe entender que las cepas de ácido láctico secretora de glucosa que difieren de las cepas de la presente invención simplemente por la introducción deliberada o aleatoria de dicha alteración en el genoma que no afectan sustancialmente las capacidades de transporte de lactosa, hidrólisis de lactosa y/o secreción de glucosa se cubren por la presente divulgación. La expresión "cepas relacionadas que tienen sustancialmente las mismas características genotípicas" se debe entender que significa cepas secretoras de glucosa en las que las partes relevantes del genoma de las cepas que se van a comparar tienen un alto grado de identidad de secuencia en comparación con unas bacterias de ácido láctico de la misma especie que no tienen la capacidad de secretar glucosa en el producto lácteo fermentado. Además, se debe entender que "cepas relacionadas que tienen sustancialmente las mismas características genotípicas" en el contexto de la presente invención significa que la cepa en cuestión tiene al menos sustancialmente la misma capacidad de transporte de lactosa, hidrólisis de lactosa y/o secreción de glucosa como cepa de bacterias de ácido láctico de la presente invención, tal como, por ejemplo, la cepa 2-83 (DSM27535) y la cepa 10.44 (DSM29077), por ejemplo, como se identifica según el método de cribado de la presente invención.

35 La expresión "cepas relacionadas que tienen sustancialmente las mismas características fenotípicas" como se usa en este documento se debe entender que se refiere a una o más propiedades observables de bacterias de ácido láctico que son el resultado de la interacción del genotipo inherente de las bacterias de ácido láctico y/o las variaciones ambientales no hereditarias. Con respecto a la presente invención, se debe entender que el término "sustancialmente las mismas características fenotípicas" se debe entender que significa que las características tienen sustancialmente la misma capacidad de transporte de lactosa, hidrólisis de lactosa y/o secreción de glucosa que la cepa bacteriana del ácido láctico de la presente invención, como por ejemplo las cepas DSM27535 y DSM29077, por ejemplo, como se identifica según el método de cribado de la presente invención.

40 Además, se debe entender que una cepa relacionada que tiene sustancialmente las mismas características genotípicas o fenotípicas significa una cepa que tras el cribado según la presente invención, ejerce la capacidad de secretar glucosa en una cantidad que hace posible reducir o eliminar la necesidad de azúcar adicional cuando dicha cepa se utiliza en la fermentación de la leche.

45 Además, se debe entender que otros mutantes que se originan de una cepa secretora de glucosa obtenida mediante el presente método, esto es, tal como un mutante funcionalmente equivalente que tiene sustancialmente la misma capacidad de transporte de lactosa, hidrólisis de lactosa y/o secreción de glucosa, está cubierto por la presente invención.

El término "mutante del mismo" como se usa en este documento se debe entender que significa una cepa derivada de una cepa de la presente invención por medio de, por ejemplo, ingeniería genética, condiciones de mutagénesis o mediante cultivo.

55 Según otra realización más, la bacteria de ácido láctico secretoras de glucosa de la presente invención es una cepa de bacteria de ácido láctico identificada usando el método de cribado de la presente invención.

Las bacterias de ácido láctico mutadas obtenidas según la presente invención se pueden usar para preparar diversos productos lácteos fermentados. Como se usa en este documento, "producto lácteo fermentado" se refiere a productos destinados al consumo animal, más específicamente para consumo humano, y que se obtienen por fermentación y por el uso de una bacteria de ácido láctico según la presente invención. Como un ejemplo no limitativo, "producto lácteo fermentado" se refiere a un producto seleccionado del grupo que consiste en yogur, queso y productos lácteos fermentados.

Además, se debe entender que tales productos lácteos fermentados pueden comprender además ingredientes secundarios, tales como frutas, bayas, aromas, etc. Además, se debe entender que los "productos lácteos fermentados" según la presente invención comprenden menos glucosa añadida como edulcorante en comparación con productos lácteos fermentados preparados por la bacteria de ácido láctico de la técnica anterior que no tienen la capacidad de secreción de glucosa aumentada como cepas secretoras de glucosa de la presente invención.

Se debe entender que las cepas de *S. thermophilus* según la presente invención se pueden usar en la fermentación de leche en combinación con otras cepas bacterianas usadas comúnmente en la fermentación de leche. Por ejemplo, las cepas de *S. thermophilus* se pueden usar junto con uno o más *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus*, tal como junto con cepa 9A de *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* depositada el 11 de julio de 2014 en DSMZ con el número de acceso DSM29076.

Se proporciona además una composición que comprende una cantidad apropiada de una o más cepas de *S. thermophilus* según la presente invención, y una o más cepa(s) *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus*.

De acuerdo con una realización, se proporciona una composición que comprende la cepa 10.44 de *S. thermophilus* (DSM29077) y la cepa 9A (DSM29076) de *Lactobacillus delbrueckii spp. Bulgaricus*.

#### Ejemplos

Para fines de ilustración, se dan los siguientes ejemplos. La terminología de la presente especificación debe ser interpretada por el experto en el arte a la luz de las enseñanzas y la orientación presentadas en este documento, en combinación con los conocimientos generales de la persona experta.

Ejemplo 1: Aislamiento, cultivo y caracterización de cepas de *S. thermophilus*

Las cepas de *S. thermophilus* se aislaron a partir de cultivos iniciadores de *S. thermophilus* (comercialmente disponibles de Chr. Hansen) por formación de rayas en placas de agar M17 suplementadas con 5 g/l de galactosa. Las placas de agar se incubaron a 42 °C, durante la noche, a partir de la placa de agar se inocularon en M17 líquido que comprendía 5 g/l de galactosa y se incubaron durante la noche. Las muestras de los cultivos obtenidos se añadieron a glicerol y se almacenaron a -80 °C.

El caldo de cultivo M17 Oxoid CM0817 (Oxoid Microbiology Products de Thermo Scientific) se almacenó y se preparó según la prescripción del fabricante. Las placas de agar M17 comprendían 15 g de agar/l.

Para investigar la cinética de crecimiento de *S. thermophilus* cultivado, las cepas aisladas se cultivaron en placas de microtitulación en presencia de glucosa, galactosa y lactosa, respectivamente, en diferentes concentraciones (5, 24 y 48 g/l, respectivamente). 3% en volumen de cultivos nocturnos cultivados en M17 que comprenden la misma fuente de carbono se añadieron a cada pocillo y se incubaron a 42 °C (atmósfera húmeda) en una incubadora Cytomat 2 450A integrada en un sistema robotizado de manipulación de líquidos. La densidad óptica se midió a 600 nm en los cultivos cada hora durante aproximadamente 28 horas. La curva de crecimiento para el cultivo YF-L702 probado se muestra en la figura 1.

Ejemplo 2: Mutagénesis de *S. thermophilus*

Se hicieron crecer tres cepas de *S. thermophilus* obtenidas en el ejemplo 1 hasta la fase estacionaria temprana (tubos de 50 ml, en M17 a 37 °C y con rotación). Se transfirió una muestra (20 ml) de cada cepa a otro tubo y se sonicó (salida 5, ciclo de trabajo 40%, 20 s, Branson Sonifier 250). Cada cultivo se diluyó con M17 precalentado y se cultivó durante 2 horas con rotación. Las muestras de cada cultivo se expusieron luego a metanosulfonato de etilo (EMS) a diversas concentraciones (0, 0.25, 0.5, 1.0, y 2.0 %v/v) y se incubaron durante 60 minutos a 37 °C con rotación. Las muestras se centrifugaron, se lavaron con 0.9% NaCl enfriado con hielo y se resuspendieron en 12 ml de M17. Antes de continuar con el cultivo, almacenamiento o análisis, las muestras fueron sonicadas de nuevo.

Ejemplo 3: Cribado de mutantes secretores de glucosa basándose en el ensayo de actividad de lactasa.

Los mutantes sometidos al método de mutagénesis en el ejemplo 2 se probaron inicialmente para determinar su capacidad para producir glucosa midiendo la actividad de lactasa basándose en la capacidad del mutante probado para escindir el sustrato 5-bromo-4-cloro-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-gal). La escisión de X-gal da como resultado el desarrollo de un fuerte color azul en presencia de lactasa. Dicho método se ha usado previamente para identificar

mutantes que sobreexpresan lactasa de *S. thermophilus* cultivados en agar BHI (Brain Heart infusion, Oxoid CM1135) que comprende X-gal Ibrahim and O'Sullivan (2000), *supra*).

5 Inicialmente, algunas muestras de cepas expuestas a EMS se transfirieron a agar M17 que comprende lactosa y glucosa, o agar BHI que comprende glucosa, y se añadieron 10 µg/ml y 40 µg/ml de X-Gal, respectivamente. Los resultados mostraron que las cepas probadas desarrollaron color azul a lo largo del tiempo independientemente de la cantidad de X-gal añadida. Esto fue inesperado ya que Ibrahim and O'Sullivan demostraron que las colonias de cepas de tipo salvaje de *S. thermophilus* eran de aprox. blancas sobre agar BHG que comprende 40 µg/ml de X-gal. Se observó una pequeña diferencia en el tiempo y la intensidad del desarrollo del color, aunque las colonias se volvieron azules independientemente de las concentraciones de X-gal.

10 El método de criba se realizó luego en una población más grande de mutantes de *S. thermophilus*. Se cultivaron aproximadamente 20 000 colonias de *S. thermophilus* en presencia de 1% de EMS según el método del ejemplo 2 se sembraron en 10 placas de agar M17 (25 x 25 cm) que comprenden 5 mg/ml de glucosa y 15 µg/ml de X-gal. Se cribaron 7 colonias que parecían tener un color azul mejor desarrollado en medio líquido M17 que comprendía 48 y 254 g/ml de lactosa, respectivamente, para determinar el metabolismo de la lactosa. Al menos dos de los mutantes aislados mostraron cierta acumulación de glucosa en el medio durante el cultivo. No se midió una acumulación significativa de glucosa en los medios, en los medios de la cepa de tipo salvaje de *S. thermophilus*, aunque las colonias de la cepa de tipo silvestre desarrollaron color azul.

20 Aunque los mutantes que acumulan glucosa en los medios podrían determinarse mediante el método anterior basado en la actividad de lactasa, el cribado de cepas de *S. thermophilus* basándose en su sobreexpresión de lactasa y el desarrollo del color azul cuando se cultivan en presencia de X-gal, se descubrió que era difícil, laborioso e ineficiente ya que las cepas de tipo salvaje de *S. thermophilus* también desarrollaron color azul. Además, el grado de desarrollo del color varió dependiendo del tamaño y la densidad de las colonias.

Ejemplo 4: cribado de mutantes secretores de glucosa basados en la determinación de la concentración de glucosa en el medio de cultivo.

25 Las cepas de *S. thermophilus* obtenidas en el ejemplo 1 se cultivaron en medio M17 en presencia de EMS según el ejemplo 2 usando un sistema de manipulación de líquido robótico de cultivo con una incubadora integrada y robot de manejo de líquido integrado (sistema de robot central Beckman Coulter).

30 Se obtuvo una biblioteca mutante sembrando en placa las muestras mutagenizadas de bacterias en placas de agar M17 que comprenden lactosa. Las placas de agar se incubaron durante la noche a 37 °C. Las colonias se aislaron usando un robot de selección de colonias (Genetix Q-pixil) y se transfirieron a placas de microtitulación de 384 pocillos que comprendían medio M17 con 48 g/l de lactosa. Las placas de microtitulación se cultivaron luego durante 24 horas y se centrifugaron a 4.700 g durante aproximadamente 20 minutos. Los sobrenadantes se diluyeron luego en agua en una placa de microtitulación (45 µl de agua y 5 µl de sobrenadante) y 5 µl de las muestras diluidas se transfirieron a placas de microtitulación que comprendían una mezcla de glucosa oxidasa, peroxidasa, 4-aminoantipirina y fenol. Las placas de microtitulación se agitaron durante 20 segundos a 1800 rpm y se incubaron durante 15 minutos. Se midió la absorbancia (505 nm) y se determinó la concentración de glucosa. Se usaron estándares de glucosa para la cuantificación.

40 El medio de cultivo de las cepas de tipo salvaje de los cultivos 700, 702 y 706 mostró acumulación de glucosa por debajo de 1 g/l después de 48 horas de cultivo en medio M17 que comprendía 48 g/l de lactosa. La desviación estándar en el ensayo fue de aprox. 5%. El experimento mostró además que el análisis de aprox. 10 000 muestras se realiza dentro de aproximadamente 4.5 h. Después, se realizó el cribado de aproximadamente 9600 mutantes de la cepa YF-L702 usando el método de cribado anterior. Se determinaron un número de cultivos que acumulan glucosa en el medio. También se realizó la fermentación de aproximadamente 9000 mutantes del cultivo YF-LX700.

Ejemplo 5: cribado de mutantes de una cepa de *S. thermophilus*.

45 Se sometieron a cribado 167 mutantes obtenidos en el ejemplo 4 según el presente método. Los mutantes seleccionados se transfirieron a placas de microtitulación de 96 pocillos que comprendían medio M17 con 5 g/l de lactosa (150 µl en cada pocillo). Se añadió glicerol (18% en volumen) y las muestras de los mutantes seleccionados se almacenaron a -80 °C. Los mutantes se sometieron entonces a cribado en 4 paralelo en placas de microtitulación con 384 pocillos en las mismas condiciones que en el ejemplo 4. Los resultados muestran que el método según la presente invención permite el cribado de un gran número de cepas en un tiempo razonable. Los resultados muestran además que el método de cribado proporciona un método eficiente para detectar cepas de bacterias de ácido láctico que tienen la capacidad de secretar más glucosa en el medio en comparación con la cepa original, véase la figura 2.

Los presentes inventores también han determinado la acumulación de glucosa cuando cultivan mutantes seleccionados identificados por la presente invención en leche (datos no mostrados).

Ejemplo 6: fermentación de leche con cepas mutantes.

5 Un aislado de *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* se obtuvo a partir de un cultivo de yogur comercial después de la formación de rayas en MRS (deMan, J. C., M. Rogosa, and M. E. Sharpe. 1960.. J. Bacteriol. 23:130). La secuenciación del ADN de su gen 16S ARNr se usó para la identificación. El aislado (aproximadamente 107 CFU) se sembró en placas en un medio MRS modificado que contenía 48 g/l de lactosa en lugar de 20 g/l de glucosa. El medio se suplementó con 2- desoxiglucosa 20 mM. Después de la incubación a 37 °C, durante dos días, se recogieron diez colonias de la placa a otra placa con el mismo medio. Después de otra incubación a 37 °C, durante dos días, las colonias se transfirieron y se propagaron en medio MRS modificado. Uno de estos aislados se denominó 9A *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. La cepa se propagó en medio MRS modificado a 37 °C. La cepa 9A se deposita el 11 de julio de 2014 con el número de acceso DSM29076.

10 Se inoculó leche con una mezcla de la cepa 10.44 de *S. thermophilus* (aislada e identificada con mutagénesis aleatoria y cribada como se muestra en los ejemplos 2, 4 y 5, y depositada el 11 de julio de 2014 con el número de acceso DSM29077) y cepa 9A de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y se incubaron a 42 °C. El pH fue controlado continuamente y registrado por un ordenador durante todo el período de incubación mediante el uso de un medidor de pH con el electrodo colocado en la leche. Antes de la inoculación en leche, la cepa 10.44 de *S. thermophilus* había crecido durante la noche en M17 que contenía 48 g/l de lactosa y la cepa 9A *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* en MRS modificado. El nivel de inoculación en la leche fue el mismo para ambas cepas, correspondiendo cada una a OD<sub>600</sub> de 0.003. El pH de la leche durante el cultivo se muestra en la figura 3. El contenido de glucosa, lactato, lactosa y galactosa al final del cultivo se midió usando HPLC. Las muestras se centrifugaron a 16.800 rpm g durante 5 minutos y se filtraron a través de filtros de jeringa de 0.2 µm (Gelman Sciences, Ann Arbor, EE. UU.) antes del análisis por HPLC. Se usó un cromatógrafo Shimadzu equipado con un autoinyector (SIL-9A, Shimadzu, Japón) y una columna Aminex HPX-87-H (BioRad Laboratories, EE. UU.) que funciona a 45 °C y un detector RI (RID 6A, Shimadzu, Japón). Como eluyente, se usó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM (0.6 ml min<sup>-1</sup>). Se usaron estándares comerciales para la calibración. Se midió una concentración de 9.5 g de glucosa por litro al final del período de fermentación en leche inoculada con la cepa 10.44 de *S. ther-mophilus* y la cepa 9A *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Se produjo menos de 1 gramo de glucosa por litro en cultivos de mezclas de las cepas de tipo salvaje/originales cultivadas en las mismas condiciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de cribado a gran escala para identificar una bacteria de ácido láctico secretora de glucosa, en el que el método comprende las etapas de:
- 5 i) someter bacterias de ácido láctico a condiciones de mutagénesis, en el que la condición de mutagénesis consiste en la exposición de bacterias de ácido láctico a cualquier mutágeno convencional de origen físico (por ejemplo, radiación X, radiación UV) o químico (por ejemplo, mutágenos);
- ii) seleccionar las colonias obtenidas en la etapa i) por separado y transferir dichas colonias para su crecimiento en una matriz en medios de crecimiento que comprenden lactosa como única fuente de hidratos de carbono;
- 10 iii) ensayar la cantidad de glucosa presente en el sobrenadante del cultivo después del crecimiento de la etapa ii) mediante el uso de:
- a) glucosa oxidasa; peroxidasa; y sustrato de señal de peroxidasa; o
- b) glucoquinasa, hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, ATP y NAD o NADP; o
- c) glucosa deshidrogenasa y un aceptor de electrones;
- 15 en el que la cantidad de glucosa secretada en el medio de cultivo es proporcional a la cantidad de sustancia señal obtenida por la transformación del sustrato de señal de peroxidasa en a) o la cantidad de NADH o NADPH producida en b), o la cantidad de aceptor de electrones reducido en c).
2. Método según la reivindicación 1, en el que las cepas de bacterias lácticas se sonicán después y opcionalmente antes de la etapa i).
- 20 3. Método según la reivindicación 1, en el que la cepa de ácido láctico parenteral se selecciona del grupo que consiste en cepas de *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.* (por ejemplo, *Streptococcus thermophilus*), *Lactobacillus spp.* (por ejemplo, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus subsp. casei*), *Leuconostoc spp.*, *Pseudoleuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*, y *Bifidobacterium spp.*
4. Método según la reivindicación 3, en el que la cepa de ácido láctico parenteral es *S. thermophilus*.
- 25 5. Método según la reivindicación 1, en el que el mutágeno se selecciona del grupo que consiste en n-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG) y etano metanosulfonato (EMS).
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el cribado se realiza usando glucosa oxidasa, peroxidasa y un sustrato de señal de peroxidasa.
- 30 7. Un método según la reivindicación 1, para identificar una cepa de *S. thermophiles* secretora de glucosa, en el que el método comprende las etapas de:
- i) someter bacterias *S. thermophiles* a condiciones de mutagénesis, donde la condición de mutagénesis consiste en la exposición de bacterias de ácido láctico a cualquier mutágeno convencional de origen físico (por ejemplo, radiación X, radiación UV) o químico (por ejemplo, mutágenos);
- 35 ii) seleccionar las colonias obtenidas en la etapa i) por separado y transferir dichas colonias para su crecimiento en una matriz en medios de crecimiento que comprenden lactosa como única fuente de hidratos de carbono;
- iii) ensayar la cantidad de glucosa presente en los sobrenadantes de cultivo después del crecimiento de la etapa ii) mediante el uso de glucosa oxidasa; peroxidasa; y un sustrato de señal de peroxidasa;
- en el que la cantidad de glucosa secretada en el medio de cultivo es proporcional a la cantidad de sustancia señal obtenida por la transformación del sustrato de señal de peroxidasa en iii).
- 40 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sustrato de peroxidasa se selecciona del grupo que consiste en 4-amino-antipireno, 4-aminoantipirina, 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico). (ABTS), o-dianisidina, o-fenilendiamina (OPD) y 4- (2-piridilazo)resorcinol, N-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (Amplex Red).
9. Método según la reivindicación 7, en el que el sustrato de peroxidasa es 4-amino-antipirina.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cantidad de sustancia de señal o NAHD o NADPH o aceptor de electrones reducido formado en iii) (b) se mide fotométricamente.
11. Método según la reivindicación 8, en el que la cantidad de sustancia señal formada se mide por espectrofotometría, luminiscencia o fluorescencia.
- 5 12. Método según la reivindicación 10, en el que la cantidad de NAHD se mide por espectrofotometría.
13. Una cepa de *S. thermophilus* del ácido láctico secretora de glucosa seleccionada del grupo que consiste en la cepa 2-83 de *S. thermophilus* depositada en virtud del Tratado de Budapest en DSMZ con el número de acceso DSM27535 y la cepa de bacterias de ácido láctico 10.44 depositada en DSMZ con el número de acceso DSM29077.
- 10 14. El uso de una cepa de bacteria de ácido láctico según la reivindicación 13 en la fabricación de un producto de leche fermentada.
- 15 15. Producto lácteo fermentado que comprende una cepa bacteriana secretora de glucosa según la reivindicación 13.
16. El uso de glucosa oxidasa, peroxidasa, glucoquinasa, hexoquinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y glucosa deshidrogenasa en un método de cribado de alto rendimiento para la identificación de bacterias de ácido láctico secretoras de glucosa, en el que dicho uso implica exponer las bacterias de una condición de mutagénesis, en el que la condición de mutagénesis consiste en la exposición de bacterias de ácido láctico a cualquier mutágeno convencional de origen físico (por ejemplo, radiación X, radiación UV) o químico (por ejemplo, mutágenos) y cultivo de bacterias que crecen en lactosa como única fuente de carbono.
17. El uso según la reivindicación 16 de glucosa oxidasa, peroxidasa y glucoquinasa en un método de criba de alto rendimiento para la identificación de la cepa de *S. thermophilus* secretora de glucosa.
- 20 18. Composición que comprende al menos una cepa de *S. thermophilus* según la reivindicación 13 y al menos una cepa de *Lactobacillus delbrückii* spp. *bulgaricus*.
19. Composición según la reivindicación 18, que comprende la cepa *S. thermophilus* es la cepa 10.44 (DSM29077) y la cepa 9A (DSM29076) de *Lactobacillus delbrückii* spp. *bulgaricus*.

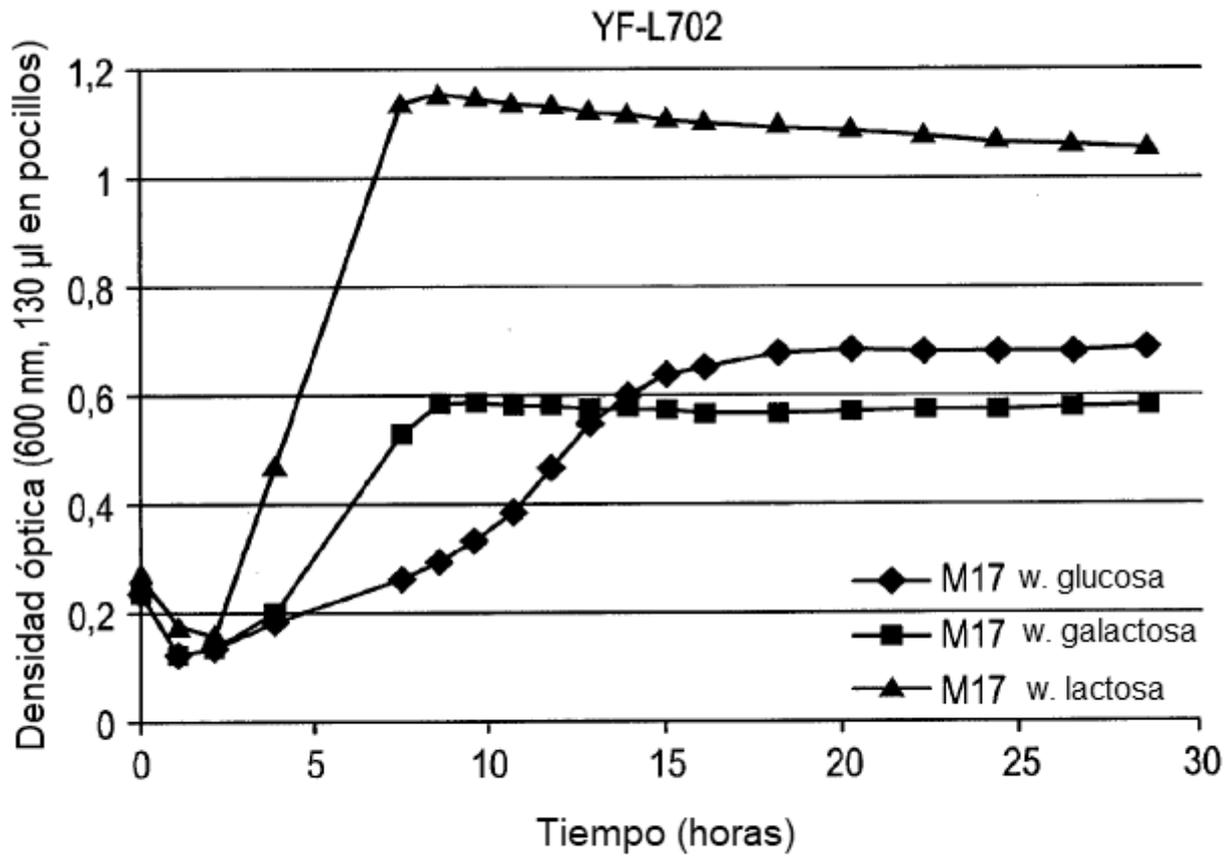
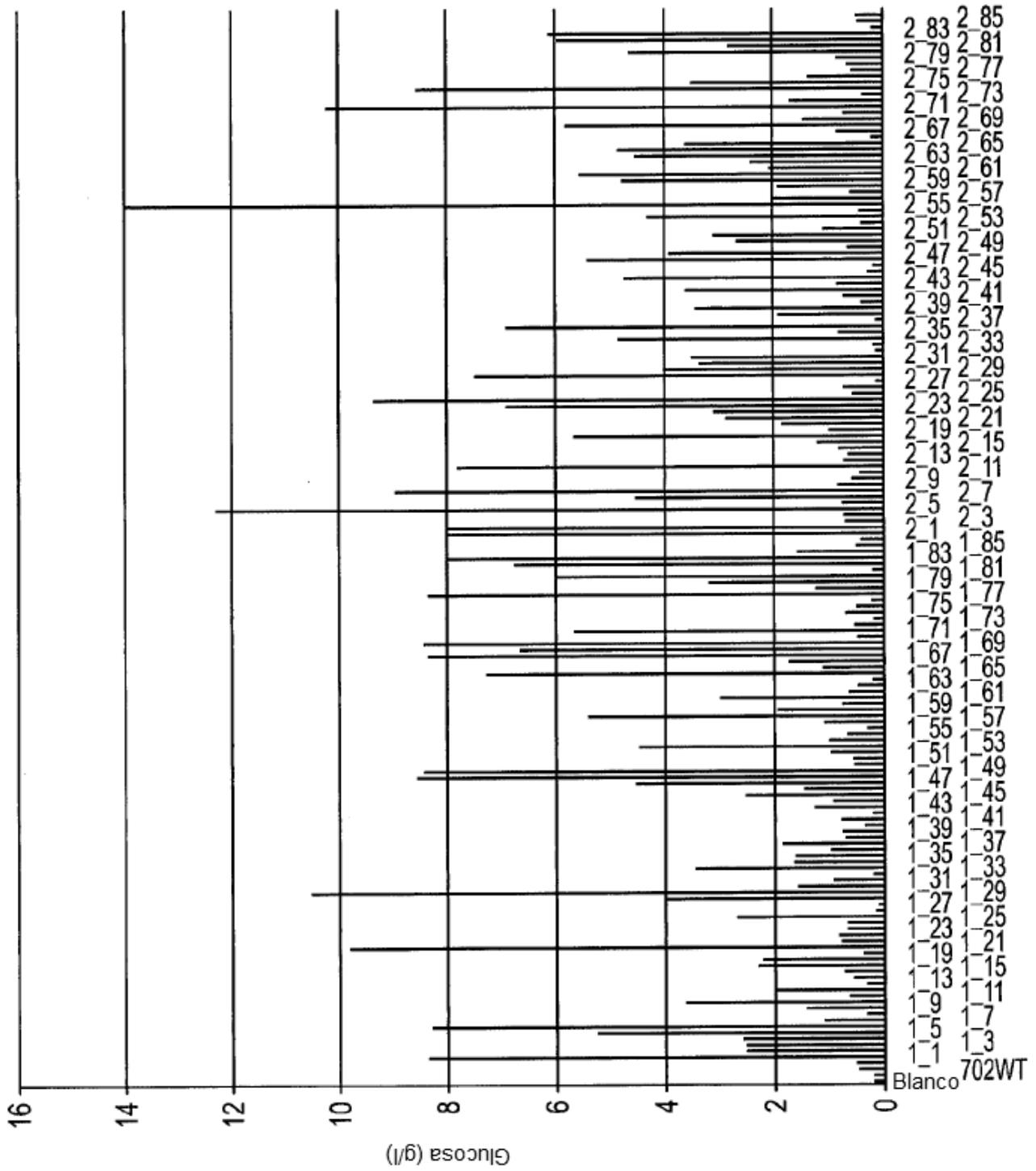


FIG. 1

FIG. 2



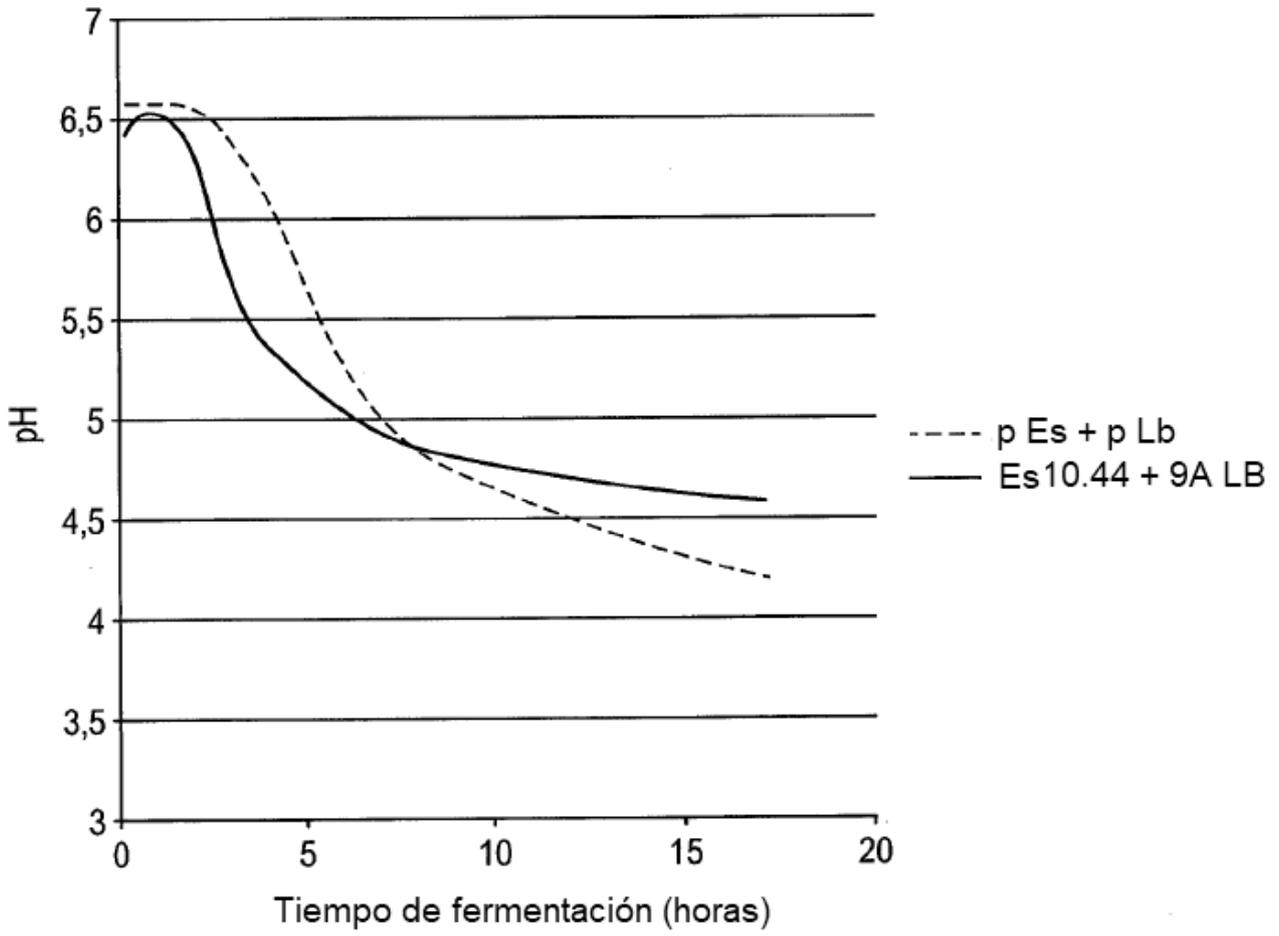


FIG. 3