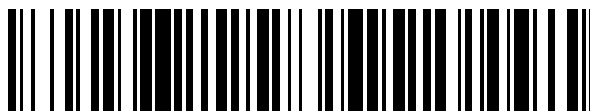


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 670**

51 Int. Cl.:

A23C 9/123	(2006.01)
C12N 1/20	(2006.01)
C12R 1/46	(2006.01)
A23C 9/13	(2006.01)
A23C 9/127	(2006.01)
A23C 21/02	(2006.01)
A23C 19/032	(2006.01)
A23L 33/135	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2014 PCT/EP2014/065286**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015 WO15007791**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2014 E 14739458 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 3021679**

54 Título: **Cepas de Streptococcus thermophilus**

30 Prioridad:

17.07.2013 EP 13176911

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

17.10.2019

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)
Langebrogade 1
1411 Copenhagen K, DK**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 727 670 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 *Streptococcus thermophilus*

5 Campo de la invención

La presente solicitud se refiere a cepas de *Streptococcus thermophilus*, utilizables como cultivos iniciadores, capaces de proporcionar tanto propiedades reológicas como organolépticas satisfactorias, y una vida útil de almacenamiento satisfactoria para los medios en los que se incorporan. En particular, estas cepas también son resistentes a bacteriófagos, al minimizar de este modo la infección por bacteriófagos. La solicitud también se refiere a una composición que comprende una de estas cepas de *Streptococcus thermophilus*, y productos alimenticios para seres humanos o para animales obtenidos con estas cepas.

15 Antecedentes de la invención

La industria alimentaria utiliza bacterias con el fin de mejorar el sabor y la textura de los productos alimenticios para seres humanos o para animales. En el caso de la industria láctea, se utilizan habitualmente bacterias del ácido láctico con el fin de, por ejemplo, llevar a cabo la acidificación de la leche (por fermentación) y texturizar el producto en el que se incorporan. Entre las bacterias del ácido láctico habitualmente utilizadas en la industria alimentaria, los ejemplos incluyen los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Bifidobacterium*.

Las bacterias del ácido láctico de la especie *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) se utilizan ampliamente, solo o en combinación con otras bacterias, para la producción de productos alimenticios para seres humanos o para animales, en particular productos fermentados. Se utilizan en particular en la formulación de los cultivos iniciadores utilizados para la producción de leches fermentadas, por ejemplo yogures. *S. thermophilus* se utiliza extensamente para la elaboración de yogur y quesos, tales como quesos de tipo Emmental, Gouda, Cheddar e italianos. Estos productos tienen un elevado valor comercial, haciendo de *S. thermophilus* una especie que tiene una gran importancia económica.

30 Existe una necesidad continua en la técnica de proporcionar cepas bacterianas, en particular cepas de *S. thermophilus*, que son capaces de proporcionar no solo propiedades reológicas u organolépticas buenas o mejoradas, tales como textura y sabor, sino también una vida útil de almacenamiento satisfactoria para los productos alimenticios para seres humanos o para animales.

35 Sumario de la invención

La invención se dirige a *Streptococcus thermophilus* seleccionada entre el grupo que consiste en:

- 40 (1) la cepa DSM 27029, depositada en virtud del Tratado de Budapest el 21 de marzo de 2013 en el nombre de Danisco Deutschland GmbH ante Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH;
- (2) la cepa DSM 27030, depositada en virtud del Tratado de Budapest el 21 de marzo de 2013 en el nombre de Danisco Deutschland GmbH ante Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH;
- 45 (3) la cepa DSM 27031, depositada en virtud del Tratado de Budapest el 21 de marzo de 2013 en el nombre de Danisco Deutschland GmbH ante Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH; y
- (4) una cepa mutante de la cepa DSM 27029, de la cepa DSM 27030, o la cepa DSM 27031, en la que la cinética de acidificación de la leche de dicho mutante se caracteriza por:

- una velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 que es al menos $70,10^{-4}$ UpH/min o igual a $70,10^{-4}$ UpH/min, calculada como se describe en el Ensayo I, en particular que está comprendida entre $70,10^{-4}$ y $250,10^{-4}$, entre $70,10^{-4}$ y $200,10^{-4}$, entre $70,10^{-4}$ y $180,10^{-4}$, o entre $70,10^{-4}$ y $140,10^{-4}$ UpH/min, y
- 50 - una velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 que es inferior a $22,10^{-4}$ UpH/min o igual a $22,10^{-4}$ UpH/min, calculada como se describe en el Ensayo I, en particular que está comprendida entre $1,10^{-4}$ y $20,10^{-4}$, entre $2,10^{-4}$ y $22,10^{-4}$, o entre $2,10^{-4}$ y $20,10^{-4}$ UpH/min

55 en la que el ensayo I consiste en: leche de vaca UHT semidesnatada comercial (1,5 % de materias grasas en p/p) ["Le Petit Vendéen"; GLAC - Francia] que es suplementada con 3 % (P/P) de leche desnatada en polvo. Después de la disolución, la mezcla es tratada térmicamente a 90 °C durante 10 min. La etapa de calentamiento de 20-25 °C a 90 °C no se prolongará más de 35 min y la etapa de enfriamiento de 90 °C a 35 °C-45 °C no se prolongará más de 45 min. Justo antes de la inoculación, se añade 1 g/100 l (p/v) de formiato de sodio. La inoculación se lleva a cabo con cepas conservadas a -80 °C en un medio a base de leche. La tasa de inoculación es $1,10^6$ UFC/ml de base de leche. La temperatura de incubación se establece en 43 °C +/- 1 °C, y se mantiene constante en un baño de agua durante la fermentación. Se utilizó un sistema Cinac para la medición en línea del cambio del pH. El pH es registrado cada 5 min durante 24 h, y resumido en una tabla o presentado como una curva CINAC. Se determinaron los 3 siguientes parámetros: tiempo para pH = 6,00 ($T_{pH6,00}$), tiempo para pH = 5,30 ($T_{pH5,30}$) y tiempo para pH = 5,00 ($T_{pH5,00}$). Estos parámetros son obtenidos directamente por el registro en línea, o cuando el tiempo para obtener el pH objetivo no está presente en la tabla, se realiza una interpolación lineal entre los dos datos registrados.

La solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus*, en la que la cinética de acidificación de la leche de dicha cepa se caracteriza por una velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 que es al menos $70,10^{-4}$ UpH/min o igual a $70,10^{-4}$ UpH/min, y una velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 que es inferior a $22,10^{-4}$ UpH/min o igual a $22,10^{-4}$ UpH/min, y/o una relación de (1) velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 a (2) velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30, que es inferior o igual a 25 %. En una realización particular, la cepa es la cepa DSM 27029, la cepa DSM 27030, o la cepa DSM 27031, todas las cuales son depositadas el 21 de marzo de 2013 ante Leibniz-Institut DSMZ.

La invención proporciona una composición que comprende o consiste en un cultivo de la cepa de *Streptococcus thermophilus* de la invención, y opcionalmente comprende además al menos otro microorganismo, en particular al menos otro(s) cultivo(s) de bacterias del ácido láctico o bacterias propiónicas.

La invención se refiere al uso de un cultivo de una cepa de *S. Thermophilus* o a una composición de la invención para preparar un producto, en particular un producto alimenticio para seres humanos o para animales, en particular un producto fermentado, en particular un producto alimenticio fermentado para seres humanos o para animales.

La invención está dirigida asimismo a un método para la preparación de un producto, en particular un producto fermentado, en el que dicho método comprende la adición de la cepa de *S. thermophilus* o una composición de la invención en un sustrato, en particular un sustrato de leche, opcionalmente fermentación de dicho sustrato, y obtención de dicho producto.

La invención también proporciona un producto, en particular un producto lácteo, en particular un producto fermentado, que comprende un cultivo de la cepa de *S thermophilus* o una composición de la invención.

Descripción de las figuras

Figura 1: velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 (S2) como una función de la velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 (S1), para 69 cepas de *S. thermophilus*. Ejemplos de cepas de la invención están representados por cuadrados negros, en comparación con otras cepas de *S. thermophilus* (diamantes grises).

Figura 2: (A) velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 (S2) como una función de la velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 (S1), para 9 cepas conocidas de *S. thermophilus* (diamantes grises) y 3 cepas de la invención (cuadrados negros); (B) relación S2/S1 (en %) para 12 cepas de *S. thermophilus* de (A) anterior.

Descripción de la invención

Los inventores han identificado cepas de *Streptococcus thermophilus* que tienen una cinética de acidificación de la leche sorprendente y atípica. Los inventores han demostrado que estas cepas se pueden utilizar para la producción o fermentación de productos para seres humanos o para animales. En particular, estas cepas dan productos con propiedades reológicas y/u organolépticas satisfactorias, así como productos con una vida útil de almacenamiento satisfactoria, al menos similar a los productos obtenidos utilizando cepas ya existentes de *Streptococcus thermophilus*. De forma interesante, el estudio de más de 60 cepas conocidas de *Streptococcus thermophilus*, desvelado en las solicitudes de patentes anteriores o en la literatura, ha permitido identificar las cepas de *S. thermophilus* con una cinética de acidificación de la leche atípica.

La solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus*, en la que la cinética de acidificación de la leche de dicha cepa se caracteriza por:

- una velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 que es al menos $70,10^{-4}$ UpH/min o igual a $70,10^{-4}$ UpH/min, y
- una velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 que es inferior a $22,10^{-4}$ UpH/min o igual a $22,10^{-4}$ UpH/min.

Se hace referencia a la velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 en la presente solicitud como S1. Se hace referencia a la velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 en la presente solicitud como S2. La velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 y la velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 se determinan en un sustrato a base de leche, en particular en leche de vaca (cinética de acidificación de la leche), tal como "Le Petit Vendéen". Ambas velocidades promedio de acidificación S1 y S2 se determinan por medio de cualquier medio convencional. En particular, S1 y S2 se calculan utilizando un sistema Cinac (CINAC, un sistema automatizado para el control de fermentos lácticos; Corrieu G, Picque D, Perret B, Quemener P; Process Magazine; 1992:1068; págs. 24-27). Un sistema automatizado para medir la tasa de acidificación es bien conocido por personas normalmente expertas en la materia. Se puede encontrar una referencia, por ejemplo, en la patente FR2629612. S1 y S2 se calculan a partir de la misma muestra, en particular a partir de la misma curva de acidificación de la leche. Un ejemplo de datos obtenidos que utilizan el sistema CINAC y permite el cálculo de las velocidades promedio de acidificación S1 y S2, se desvela en el ejemplo 1.

En una realización particular, S1 y S2 se calculan como se describe en el ensayo o utilizando el mismo presentado como Ensayo I (definido con detalle en el ejemplo 1 a continuación). Cabe mencionar que S1 y S2 se calculan utilizando solo una cepa de *S. thermophilus*.

5 En una realización particular, la solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus*, en la que la cinética de acidificación de la leche de dicha cepa se caracteriza por:

- 10 - una velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 que está comprendida entre $70,10^{-4}$ y $250,10^{-4}$ UpH/min, entre $70,10^{-4}$ y $200,10^{-4}$ UpH/min, entre $70,10^{-4}$ o entre $180,10^{-4}$ UpH/min, o $70,10^{-4}$ y $140,10^{-4}$ UpH/min; y
- una velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 que está comprendida entre $1,10^{-4}$ y $20,10^{-4}$ UpH/min, entre $2,10^{-4}$ y $22,10^{-4}$ UpH/min, o entre $2,10^{-4}$ y $20,10^{-4}$ UpH/min.

15 En una realización particular, la solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus*, en la que la cinética de acidificación de la leche de dicha cepa se caracteriza por:

- 20 - una velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 que está comprendida entre $70,10^{-4}$ y $250,10^{-4}$, $70,10^{-4}$ y $200,10^{-4}$, $70,10^{-4}$ y $180,10^{-4}$, o $70,10^{-4}$ y $140,10^{-4}$ UpH/min, calculada como se describe en el Ensayo I; y
- una velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 que está comprendida entre $1,10^{-4}$ y $20,10^{-4}$, $2,10^{-4}$ y $22,10^{-4}$, o $2,10^{-4}$ y $20,10^{-4}$ UpH/min, calculada como se describe en el Ensayo I.

25 En una realización más particular, la velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 (S1), preferentemente calculada como se describe en el Ensayo I, está comprendida entre $80,10^{-4}$ y $120,10^{-4}$, entre $90,10^{-4}$ y $110,10^{-4}$, o entre $95,10^{-4}$ y $105,10^{-4}$ UpH/min.

En una realización más particular, la velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 (S2), preferentemente calculada como se describe en el Ensayo I, está comprendida entre $5,10^{-4}$ y $20,10^{-4}$ UpH/min, o entre $10,10^{-4}$ y $18,10^{-4}$ UpH/min.

30 En una realización particular, la solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus*, en la que la cinética de acidificación de la leche de dicha cepa se caracteriza por:

- 35 - una velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 que está comprendida entre $70,10^{-4}$ y $250,10^{-4}$, entre $70,10^{-4}$ y $200,10^{-4}$, entre $70,10^{-4}$ y $180,10^{-4}$, entre $70,10^{-4}$ y $140,10^{-4}$, entre $80,10^{-4}$ y $120,10^{-4}$, entre $90,10^{-4}$ y $110,10^{-4}$, o entre $95,10^{-4}$ y $105,10^{-4}$ UpH/min, preferentemente calculada como se describe en el Ensayo I, y
- una velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 que está comprendida entre $1,10^{-4}$ y $20,10^{-4}$, entre $2,10^{-4}$ y $22,10^{-4}$, entre $2,10^{-4}$ y $20,10^{-4}$, entre $5,10^{-4}$ y $20,10^{-4}$ o entre $10,10^{-4}$ y $18,10^{-4}$ UpH/min, preferentemente calculada como se describe en el Ensayo I.

40 La solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus*, en la que la cinética de acidificación de la leche de dicha cepa se caracteriza por una relación de (1) velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00, preferentemente calculada como se describe en el Ensayo I, a (2) velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30, preferentemente calculada como se describe en el Ensayo I, que es inferior o igual a 25 %, o es inferior o igual a 20 %, o es inferior o igual a 18 %. La velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 y la velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 se definen y determinan según las realizaciones descritas anteriormente. La relación (en %) se calcula de la siguiente manera [relación de S2 a S1 o relación de S2/S1]:

$$\frac{\text{velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 (S2)}}{\text{velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 (S1)}} \times 100$$

50 Como se ha mencionado anteriormente, S1 y S2 se calculan a partir de la misma muestra, en particular a partir de la misma curva de acidificación cuando se utiliza el sistema CINAC.

55 En una realización particular, la relación de S2/S1 está comprendida entre 1 y 25 %, entre 2 % y 25 %, entre 5 y 18 %, entre 8 y 18 % o entre 10 y 18 %.

En una realización particular, la solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus* en la que la cinética de acidificación de la leche de dicha cepa se caracteriza por:

- 60 - una velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 que es al menos $70,10^{-4}$ UpH/min o igual a $70,10^{-4}$ UpH/min, y
- una velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 que es inferior a $22,10^{-4}$ UpH/min o igual a $22,10^{-4}$ UpH/min, y
- una relación de (1) velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 a (2) velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30, que es inferior o igual a 25 %, o es inferior o igual a 20 %, o es inferior o igual a 18 %,

65

en la que preferentemente la velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 y la velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 se calculan como se describe en el Ensayo I.

5 La velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 y la velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 se definen y determinan según las realizaciones descritas anteriormente.

En una realización particular, la solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus* en la que la cinética de acidificación de la leche de dicha cepa se caracteriza por:

- 10
- una velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 que está comprendida entre $70,10^{-4}$ y $250,10^{-4}$, entre $70,10^{-4}$ y $200,10^{-4}$, entre $70,10^{-4}$ y $180,10^{-4}$, entre $70,10^{-4}$ y $140,10^{-4}$, entre $80,10^{-4}$ y $120,10^{-4}$, entre $90,10^{-4}$ y $110,10^{-4}$, o entre $95,10^{-4}$ y $105,10^{-4}$ UpH/min, y
 - una velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 que está comprendida entre $1,10^{-4}$ y $20,10^{-4}$, entre $2,10^{-4}$ y $22,10^{-4}$, entre $2,10^{-4}$ y $20,10^{-4}$, entre $5,10^{-4}$ y $20,10^{-4}$ o entre $10,10^{-4}$ y $18,10^{-4}$ UpH/min, y
 - 15 - una relación de (1) velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 a (2) velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30, que está comprendida entre 1 y 25 %, entre 2 y 25 %, entre 5 y 18 %, entre 8 y 18 % o entre 10 y 18 %,

20 en la que preferentemente la velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 y la velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 se calculan como se describe en el Ensayo I.

La velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 y la velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 se definen y determinan según las realizaciones descritas anteriormente.

25 La solicitud se refiere a cualquier cepa de *Streptococcus thermophilus* definida por la combinación de cualquier intervalo o máximo de relación S1/S2 como se desvela en la presente memoria, con cualquier intervalo o máximo de S2 como se desvela en la presente memoria, y con cualquier intervalo o mínimo de S1 como se desvela en la presente memoria.

30 Como realización particular, la solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus* en la que la cinética de acidificación de la leche de dicha cepa se caracteriza por:

- 35
- una velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 que está comprendida entre $90,10^{-4}$ y $110,10^{-4}$ UpH/min, o entre $95,10^{-4}$ y $105,10^{-4}$ UpH/min; y
 - una velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 que está comprendida entre $5,10^{-4}$ y $20,10^{-4}$ UpH/min o entre $10,10^{-4}$ y $18,10^{-4}$ UpH/min; y
 - una relación de (1) velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 a (2) velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30, que está comprendida entre 8 y 18 % o entre 10 y 18 %,

40 en la que preferentemente la velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 y la velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 se calculan como se describe en el Ensayo I.

45 Las características particulares descritas en la presente memoria con respecto a las velocidad de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 (S2), con respecto a la velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 (S1), con respecto a la relación S2/S1 y/o con respecto a los métodos de cálculo de S1 y S2, en particular el sistema CINAC, ponen en práctica todas las realizaciones de la cepa de *S. thermophilus* descrita en la solicitud.

50 Considerando que todas las cepas conocidas de *S. thermophilus* presentan un estrecho vínculo entre la velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 (S2), y la velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 (S1) [es decir, cuanto mayor sea el valor de S1, cuanto mayor sea el valor de S2], la solicitud se refiere en la presente memoria por vez primera a cepas de *Streptococcus thermophilus* para las que la velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 (S2) se separa de la velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 (S1).

55 La solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus* de la invención que se caracteriza adicionalmente, además de a) su velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 (S2) como se define en la presente memoria y su velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 (S1) como se define en la presente memoria, y/o b) su relación S2/s1 como se define en la presente memoria, por la presencia en su genoma de al menos un elemento seleccionado entre el grupo que consiste en un locus CRISPR4, un locus CRISPR1, y un locus CRISPR3, siendo cada elemento definido en lo sucesivo.

60

65 Las características estructurales comunes de un sistema de CRISPR-Cas se describen en Jansen *et al.* (2002, Janssen *et al.* (2002) OMICSJ. Integ. Biol. 6:23-33) como (i) la presencia de múltiples repeticiones directas cortas (repeticiones CRISPR), que son normalmente secuencias palindrómicas parcialmente cortas de 24-40 pb que contienen repeticiones internas y terminales invertidas de hasta 11 pb y muestran una variación de secuencia nula o

muy pequeña en un locus dado; (ii) la presencia de secuencias espaciadoras no repetitivas (espaciadores CRISPR) de tamaño similar entre las repeticiones; (iii) la presencia de una secuencia líder común de una docena a unos pocos cientos de pares de bases de la mayoría de especies que albergan múltiples loci CRISPR; y (iv) la presencia de uno o más genes *cas* (asociados a CRISPR).

5 En la presente solicitud, la expresión "locus CRISPR" se refiere a un segmento de ADN que consiste en al menos una unidad [repetición-espaciador] y una repetición terminal, que comienza con el primer nucleótido de la primera repetición CRISPR y que finaliza con el último nucleótido de la repetición terminal (última) CRISPR. Por consiguiente, un locus CRISPR consiste en al menos una unidad [repetición-espaciador], en particular diversas unidades [repetición-espaciador] (teniendo dichas diversas unidades [repetición-espaciador] una secuencia de repetición CRISPR idéntica o al menos similar para todas las unidades), seguido por una última repetición terminal (cuya secuencia es idéntica o similar, especialmente en su parte 5', respecto a la secuencia repetida CRISPR de las unidades). En el contexto de la presente solicitud, el locus CRISPR (ya sea el locus CRISPR1, CRISPR3, o CRISPR4) se orienta de la siguiente manera. El líder CRISPR es un segmento de ADN, que es generalmente rico en A/T, ubicado inmediatamente corriente arriba de la primera repetición de CRISPR del locus CRISPR. El remolque CRISPR es un segmento de ADN ubicado inmediatamente corriente abajo de la repetición terminal. Por lo tanto, el locus CRISPR está ubicado entre el líder CRISPR y el remolque CRISPR.

20 En una primera realización, la solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus* como se define en la presente memoria, cuyo genoma comprende un locus CRISPR4. En una realización particular, la solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus* como se define en la presente memoria, cuyo genoma comprende un locus CRISPR4 como se define en SEQ ID NO: 3 o comprende un locus CRISPR4 que comprende parte(s) de SEQ ID NO: 3. La SEQ ID NO: 3 contiene 12 unidades [repetición-espaciador] CRISPR4 y una repetición terminal. La secuencia de estas 12 unidades [repetición-espaciador] CRISPR4 de SEQ ID NO: 3 es como se define en la SEQ ID NO: 4 a 25 SEQ ID NO: 15, respectivamente. La secuencia de la repetición terminal CRISPR4 es como se define en la SEQ ID NO: 16. Las secuencias del líder CRISPR4 y del remolque CRISPR4 que flanquean el locus CRISPR4 de una realización particular de cepas de *Streptococcus thermophilus* son como se definen en la SEQ ID NO: 2 y en la SEQ ID NO: 1, respectivamente.

30 En una realización particular, la solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus* como se define en la presente memoria, cuyo genoma comprende un locus CRISPR4 que comprende o consiste en la secuencia definida en la SEQ ID NO: 3.

35 En una realización particular, la solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus* como se define en la presente memoria, cuyo genoma comprende un locus CRISPR4 que comprende, de 5' a 3', una parte de SEQ ID NO: 3 y una repetición terminal como se define en la SEQ ID NO: 16.

40 Por "*parte de SEQ ID NO: 3*", en el contexto del locus CRISPR4, se entiende un fragmento de SEQ ID NO: 3 que comprende al menos o exactamente 3 unidades [repetición-espaciador] CRISPR4 consecutivas contenidas en SEQ ID NO: 3, en particular al menos o exactamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11, unidades [repetición-espaciador] consecutivas contenidas en SEQ ID NO: 3. Por "*consecutivas*", se refiere a que las unidades [repetición-espaciador] CRISPR4 en dicha parte de SEQ ID NO: 3 se encuentran y vinculan en el mismo orden en que aparecen en SEQ ID NO: 3 (p. ej., SEQ ID NO: 4-SEQ ID NO: 5-SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 10-SEQ ID NO: 11-SEQ ID NO: 12). En una realización particular, una parte de SEQ ID NO: 3 es un fragmento de la SEQ ID NO: 3 que comprende al menos o 45 exactamente 3 unidades [repetición-espaciador] CRISPR4 consecutivas seleccionadas entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 15. En una realización particular, "*parte de la SEQ ID NO: 3*" se refiere a las 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 unidades [repetición-espaciador] CRISPR4 consecutivas contenidas en la SEQ ID NO: 3. Por "*unidades [repetición-espaciador] CRISPR4 terminales contenidas en la SEQ ID NO: 3*", se refiere a que las unidades [repetición-espaciador] CRISPR4 se ubican en la mayor parte de 3' (es decir, en el extremo del remolque) en el locus CRISPR4 de la SEQ ID NO: 3, es decir, inmediatamente antes de la repetición terminal como se define en la SEQ ID NO: 16. Por consiguiente, la dos unidades [repetición-espaciador] CRISPR4 terminales y consecutivas de la SEQ ID NO: 3 significan SEQ ID NO:14-SEQ ID NO:15, la 3 unidades [repetición-espaciador] CRISPR4 terminales y consecutivas de la SEQ ID NO: 3 significan SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:14-SEQ ID NO:15, etc.

55 En una segunda realización, como tal o en combinación con la primera realización, la solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus* como se define en la presente memoria, cuyo genoma comprende un locus CRISPR1.

En una realización particular, la solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus* como se define en la presente memoria, cuyo genoma comprende un locus CRISPR1 que comprende o que consiste en la secuencia como se define en SEQ ID NO: 19 o un locus CRISPR1 que comprende parte(s) de SEQ ID NO: 19.

5 La SEQ ID NO: 19 contiene 32 unidades [repetición-espaciador] CRISPR1 y 1 repetición terminal, cuya secuencia es similar pero diferente de la repetición de las 32 unidades [repetición-espaciador] CRISPR1. La secuencia de estas 32 unidades [repetición-espaciador] CRISPR1 de SEQ ID NO: 19 es como se define en la SEQ ID NO: 22 a SEQ ID NO: 53, respectivamente. La secuencia de la repetición de todas las unidades [repetición-espaciador] CRISPR1, en el locus CRISPR1 definida en la presente memoria, es como se define en la SEQ ID NO: 20 (R1). La secuencia de la repetición terminal es como se define en la SEQ ID NO: 21 (R'1). En una realización particular, el locus CRISPR1 como se define en SEQ ID NO: 19 o el locus CRISPR1 que comprende parte(s) de SEQ ID NO: 19 como se define en la presente memoria, está flanqueado por el líder de CRISPR1 y las secuencias remolque CRISPR1, como se define en SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, respectivamente.

15 Tras la exposición a fagos, una o más unidades [repetición-espaciador] CRISPR1 adicionales pueden añadirse en el locus CRISPR, en particular en la parte 5' (es decir, el extremo líder) del locus CRISPR1 como se define en la presente memoria, es decir, inmediatamente después del último nucleótido de la secuencia líder CRISPR1. Esta (estas) unidad(es) [repetición-espaciador] CRISPR1 adicional(es) tiene(n) una secuencia definida, de 5' a 3', como R1-X1, en la que R1 es como se define en la SEQ ID NO: 20, y X1 es cualquier secuencia con una longitud de 27 a 33 pb, en particular de 28 a 32 pb, en particular de 29 a 31 pb, y en particular exactamente 30 pb. En particular, la secuencia de cualquiera de estas unidades [repetición-espaciador] CRISPR1 adicionales se selecciona entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 60. Ejemplos no limitantes de unidad(es) [repetición-espaciador] CRISPR1 adicional(es), que pueden utilizarse según la invención, son como se definen en SEQ ID NO: 61 a SEQ ID NO: 70.

25 En una realización particular, la solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus* como se define en la presente memoria, cuyo genoma comprende un locus CRISPR1 que comprende o consiste en la secuencia definida en la SEQ ID NO: 19. En una realización particular, el locus CRISPR1 consiste en, de 5' a 3', al menos una unidad [repetición-espaciador] CRISPR1 adicional de la secuencia R1-X1, en particular al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más unidades [repetición-espaciador] CRISPR1 adicionales de la secuencia R1-X1 y la SEQ ID NO: 19.

30 En una realización particular, la solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus* como se define en la presente memoria, cuyo genoma comprende un locus CRISPR1 que comprende, de 5' a 3', una parte de SEQ ID NO: 19 y una repetición terminal como se define en la SEQ ID NO: 21.

35 Por "*parte de SEQ ID NO: 19*", en el contexto del locus CRISPR1, se entiende un fragmento de SEQ ID NO: 19 que comprende al menos o exactamente 3 unidades [repetición-espaciador] CRISPR1 consecutivas contenidas en SEQ ID NO: 19, en particular al menos o exactamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, o 31 unidades [repetición-espaciador] consecutivas contenidas en SEQ ID NO: 19. Por "*consecutivas*", se refiere a que las unidades [repetición-espaciador] CRISPR1 en dicha parte de SEQ ID NO: 19 se encuentran y vinculan en el mismo orden en que aparecen en SEQ ID NO: 19 (p. ej., SEQ ID NO: 23-SEQ ID NO: 24-SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 42-SEQ ID NO: 43-SEQ ID NO: 44). En una realización particular, una parte de SEQ ID NO: 19 es un fragmento de la SEQ ID NO: 19 que comprende al menos o exactamente 3 unidades [repetición-espaciador] CRISPR1 consecutivas seleccionadas entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 22 a SEQ ID NO:53.

40 En una realización particular, "*parte de la SEQ ID NO: 19*" se refiere a las unidades 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, o 31 terminales consecutivas CRISPR1 [repetición-espaciador] contenidas en la SEQ ID NO: 19. Por "*unidades [repetición-espaciador] CRISPR1 terminales contenidas en la SEQ ID NO: 19*", se refiere a que las unidades [repetición-espaciador] CRISPR1 se ubican en la mayor parte de 3' (es decir, en el extremo del remolque en el locus CRISPR1 de la SEQ ID NO: 19, es decir, inmediatamente antes de la repetición terminal R1' como se define en la SEQ ID NO: 21. Por consiguiente, la dos unidades [repetición-espaciador] CRISPR1 terminales y consecutivas de la SEQ ID NO: 19 significan SEQ ID NO:52-SEQ ID NO:53, la 3 unidades [repetición-espaciador] CRISPR1 terminales y consecutivas de la SEQ ID NO: 19 significan SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:52-SEQ ID NO:53, etc.

45 En una realización particular, el locus CRISPR1 consiste en, de 5' a 3', un número entero de unidades [repetición-espaciador], que incluye al menos 3 unidades [repetición-espaciador] CRISPR1 consecutivas contenidas en la SEQ ID NO: 19 (parte de la SEQ ID NO: 19 como se define en la presente memoria) y la repetición terminal de la SEQ ID NO: 21. En una realización particular, el locus CRISPR1 consiste en, de 5' a 3', un número entero de unidades [repetición-espaciador], que incluye al menos 3 unidades [repetición-espaciador] CRISPR1 consecutivas seleccionadas entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 22 a SEQ ID NO 53, y la repetición terminal de SEQ ID NO: 21. En una realización particular, el locus CRISPR1 consiste en, de 5' a 3', al menos una unidad [repetición-espaciador] CRISPR1 adicional de la secuencia R1-X1, en particular al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más unidades [repetición-espaciador] CRISPR1 adicionales de la secuencia R1-X1, al menos 3 unidades [repetición-espaciador] CRISPR1 consecutivas contenidas en la SEQ ID NO: 19 (parte de la SEQ ID NO: 19), y la repetición terminal de la SEQ ID NO: 21.

- En una realización particular, el locus CRISPR1 consiste en, de 5' a 3', al menos una unidad [repetición-espaciador] CRISPR1 adicional de la secuencia R1-X1, en particular al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más unidades [repetición-espaciador] CRISPR1 adicionales de la secuencia R1-X1, una parte de SEQ ID NO: 19 como se ha definido anteriormente, y la repetición terminal de SEQ ID NO: 21. En una realización particular, el locus CRISPR1 consiste en, de 5' a 3', al menos una unidad [repetición-espaciador] CRISPR1 adicional de la secuencia R1-X1, en particular al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más unidades [repetición-espaciador] CRISPR1 adicionales de la secuencia R1-X1, de 1 a 31 unidades [repetición-espaciador] CRISPR1 consecutivas y terminales contenidas en la SEQ ID NO: 19, y la repetición terminal de la SEQ ID NO: 21.
- En una tercera realización, como tal o en combinación con la primera realización, la segunda realización, o la primera y segunda realizaciones, la solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus* como se define en la presente memoria, cuyo genoma comprende un locus CRISPR3.
- En una realización particular, la solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus* como se define en la presente memoria, cuyo genoma comprende un locus CRISPR3 que comprende o que consiste en la secuencia como se define en SEQ ID NO: 73 o un locus CRISPR3 que comprende parte(s) de SEQ ID NO: 73.
- La SEQ ID NO: 73 contiene 12 unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 y 1 repetición terminal, cuya secuencia es similar que la repetición de las 12 unidades [repetición-espaciador] CRISPR3. La secuencia de estas 12 unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 de SEQ ID NO: 73 es como se define en la SEQ ID NO: 75 a SEQ ID NO: 86, respectivamente. La secuencia de la repetición de todas las unidades [repetición-espaciador] CRISPR3, en el locus CRISPR3 definida en la presente memoria, es como se define en la SEQ ID NO: 74 (R3). La secuencia de la repetición terminal es idéntica a R3 y es como se define en la SEQ ID NO: 74. En una realización particular, el locus CRISPR3 como se define en SEQ ID NO: 73 o el locus CRISPR3 que comprende parte(s) de SEQ ID NO: 73 como se define en la presente memoria, está flanqueado por el líder de CRISPR3 y las secuencias remolque CRISPR3 como se define en SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72, respectivamente.
- Tras la exposición a fagos, una o más unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 adicionales pueden añadirse en el locus CRISPR3, en particular en la parte 5' (es decir, el extremo líder) del locus CRISPR3 como se define en la presente memoria, es decir, inmediatamente después del último nucleótido de la secuencia líder CRISPR3. Esta (estas) unidad(es) [repetición-espaciador] CRISPR3 adicional(es) tiene(n) una secuencia definida, de 5' a 3', como R3-X3, en la que R3 es como se define en la SEQ ID NO: 74, y X3 es cualquier secuencia, en particular cualquier secuencia espaciadora CRISPR, con una longitud de 27 y 33 pb, en particular de 28 a 32 pb, en particular de 29 a 31 pb, y en particular exactamente 30 pb. En particular, la secuencia de cualquiera de estas unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 adicionales se selecciona entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO: 92 o SEQ ID NO: 93. Ejemplos no limitantes de unidad(es) [repetición-espaciador] CRISPR3 adicional(es), que pueden utilizarse según la invención, son como se definen en SEQ ID NO: 94 a SEQ ID NO: 103.
- En una realización particular, la solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus* como se define en la presente memoria, cuyo genoma comprende un locus CRISPR3 que comprende o consiste en la secuencia definida en la SEQ ID NO: 73. En una realización particular, el locus CRISPR3 consiste en, de 5' a 3', al menos una unidad [repetición-espaciador] CRISPR3 adicional de la secuencia R3-X3, en particular al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 adicionales de la secuencia R3-X3 y la SEQ ID NO: 73.
- En una realización particular, la solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus* como se define en la presente memoria, cuyo genoma comprende un locus CRISPR3 que comprende, de 5' a 3', una parte de SEQ ID NO: 73 y una repetición terminal como se define en la SEQ ID NO: 74.
- Por "*parte de SEQ ID NO: 73*" en el contexto del locus CRISPR3, se entiende un fragmento de SEQ ID NO: 73 que comprende al menos o exactamente 3 unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 consecutivas contenidas en SEQ ID NO: 73, en particular al menos o exactamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 unidades [repetición-espaciador] consecutivas contenidas en SEQ ID NO: 73. Por "*consecutivas*", se refiere a que las unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 en dicha parte de SEQ ID NO: 73 se encuentran y vinculan en el mismo orden en que aparecen en SEQ ID NO: 73 (p. ej., SEQ ID NO: 76-SEQ ID NO: 77-SEQ ID NO: 78 o SEQ ID NO: 82-SEQ ID NO: 83-SEQ ID NO: 84). En una realización particular, una parte de SEQ ID NO: 73 es un fragmento de la SEQ ID NO: 73 que comprende al menos o exactamente 3 unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 consecutivas seleccionadas entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 75 la SEQ ID NO: 86. En una realización particular, "*parte de la SEQ ID NO: 73*" se refiere a las 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 terminales y consecutivas contenidas en la SEQ ID NO: 73. Por "*unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 terminales contenidas en la SEQ ID NO: 73*", se refiere a que las unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 se ubican en la mayor parte de 3' (es decir, en el extremo del remolque en el locus CRISPR3 de la SEQ ID NO: 73, es decir, inmediatamente antes de la repetición terminal de SEQ ID NO: 74. Por consiguiente, las dos unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 terminales y consecutivas de la SEQ ID NO: 73 significan SEQ ID NO:85-SEQ ID NO:86, la 3 unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 terminales y consecutivas de la SEQ ID NO: 73 significan SEQ ID NO:84-SEQ ID NO:85-SEQ ID NO:86, etc.

En una realización particular, el locus CRISPR3 consiste en, de 5' a 3', un número entero de unidades [repetición-espaciador], que incluye al menos 3 unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 consecutivas contenidas en la SEQ ID NO: 73 (parte de la SEQ ID NO: 73 como se define en la presente memoria) y la repetición terminal de la SEQ ID NO: 74. En una realización particular, el locus CRISPR3 consiste en, de 5' a 3', un número entero de unidades [repetición-espaciador], que incluye al menos 3 unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 consecutivas seleccionadas entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 75 a SEQ ID NO 86, y la repetición terminal de SEQ ID NO: 74. En una realización particular, el locus CRISPR3 consiste en, de 5' a 3', al menos una unidad [repetición-espaciador] CRISPR3 adicional de la secuencia R3-X3, en particular al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 adicionales de la secuencia R3-X3, al menos 3 unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 consecutivas contenidas en la SEQ ID NO: 73 (parte de la SEQ ID NO: 73), y la repetición terminal de la SEQ ID NO: 74.

En una realización particular, el locus CRISPR3 consiste en, de 5' a 3', al menos una unidad [repetición-espaciador] CRISPR3 adicional de la secuencia R3-X3, en particular al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 adicionales de la secuencia R3-X3, una parte de SEQ ID NO: 73 como se ha definido anteriormente, y la repetición terminal de SEQ ID NO: 74. En una realización particular, el locus CRISPR3 consiste en, de 5' a 3', al menos una unidad [repetición-espaciador] CRISPR3 adicional de la secuencia R3-X3, en particular al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 adicionales de la secuencia R3-X3, de 1 a 11 unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 consecutivas y terminales contenidas en la SEQ ID NO: 73, y la repetición terminal de la SEQ ID NO: 74.

En una realización particular, la solicitud se refiere a una cepa de *Streptococcus thermophilus* en la que la cinética de acidificación de la leche de dicha cepa se caracteriza por:

- a) una velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 que es al menos $70,10^{-4}$ UpH/min o igual a $70,10^{-4}$ UpH/min o está comprendida entre $70,10^{-4}$ y $250,10^{-4}$, entre $70,10^{-4}$ y $200,10^{-4}$, entre $70,10^{-4}$ y $180,10^{-4}$, entre $70,10^{-4}$ y $140,10^{-4}$, entre $80,10^{-4}$ y $120,10^{-4}$, entre $90,10^{-4}$ y $110,10^{-4}$, o entre $95,10^{-4}$ y $105,10^{-4}$ UpH/min, y una velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 que es inferior a $22,10^{-4}$ UpH/min o igual a $22,10^{-4}$ UpH/min o está comprendida entre $1,10^{-4}$ y $20,10^{-4}$, entre $2,10^{-4}$ y $22,10^{-4}$, entre $2,10^{-4}$ y $20,10^{-4}$, entre $5,10^{-4}$ y $20,10^{-4}$ o entre $10,10^{-4}$ y $18,10^{-4}$ UpH; y/o
- b) una relación de (1) velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 a (2) velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30, que es inferior o igual a 25 %, o inferior o igual a 20 %, inferior o igual a 18 %, o está comprendida entre 1 y 25 %, entre 2 y 25 %, entre 5 y 18 %, entre 8 y 18 % o entre 10 y 18 %,

en la que preferentemente la velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 y la velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 se calculan como se describe en el Ensayo I, y cuyo genoma comprende al menos un elemento seleccionado entre el grupo que consiste en un locus CRISPR4, un locus CRISPR1, y un locus CRISPR3 como se define en la presente memoria, preferentemente cuyo genoma comprende uno, dos o tres elementos seleccionados entre este grupo.

La invención se dirige a la cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada en virtud del Tratado de Budapest el 21 de marzo de 2013 en el nombre de Danisco Deutschland GmbH ante Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig), con el número DSM 27029 [en la presente memoria la cepa DSM 27029].

La invención también se dirige a la cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada en virtud del Tratado de Budapest el 21 de marzo de 2013 en el nombre de Danisco Deutschland GmbH ante Leibniz-Institut DSMZ, con el número DSM 27030 [en la presente memoria la cepa DSM 27030].

La invención también se dirige a la cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada en virtud del Tratado de Budapest el 21 de marzo de 2013 en el nombre de Danisco Deutschland GmbH ante Leibniz-Institut DSMZ, con el número DSM 27031 [en la presente memoria la cepa DSM 27031].

Por la presente se confirma que el depositante, Danisco Deutschland GmbH (de Busch-Johannsen-Strasse 1, D-25899 Niebüll, Alemania) ha autorizado al solicitante (DuPont Nutrition Biosciences ApS, Langebrogade 1, DK-1411, Copenhagen K, Dinamarca) a referirse a los materiales biológicos depositados en la presente solicitud y han dado su consentimiento sin reservas e irrevocable de los materiales depositados que están siendo puestos a disposición del público.

Con respecto a estas designaciones en los que se solicita una patente europea, una muestra del microorganismo depositado estará disponible hasta la publicación de la mención de la concesión de la patente europea o hasta la fecha en que la aplicación ha sido rechazada o retirada o se considera a retirar, solo por la edición de tal muestra por un experto designado por la persona que solicita la muestra, y aprobado.

En una realización particular, la cepa de *Streptococcus thermophilus* de la invención es una cepa mutante de la cepa DSM 27029, de la cepa DSM 27030, o de la cepa DSM 27031 como se desvela en la presente memoria,

proporcionaron que la cinética de acidificación de la leche de dicha cepa mutante es según con las definiciones dadas en la presente memoria para cualquier cepa de *Streptococcus thermophilus* de la invención, y en particular es similar a la cinética de acidificación de la leche de las cepas depositadas ante DSM desde las que los mutantes se derivan. En particular, la cinética de acidificación de la leche de dicha cepa se caracteriza por:

a) una velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 que es al menos $70,10^{-4}$ UpH/min o igual a $70,10^{-4}$ UpH/min o está comprendida entre $70,10^{-4}$ y $250,10^{-4}$, entre $70,10^{-4}$ y $200,10^{-4}$, entre $70,10^{-4}$ y $180,10^{-4}$, entre $70,10^{-4}$ y $140,10^{-4}$, entre $80,10^{-4}$ y $120,10^{-4}$, entre $90,10^{-4}$ y $110,10^{-4}$, o entre $95,10^{-4}$ y $105,10^{-4}$ UpH/min, y una velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 que es inferior a $22,10^{-4}$ UpH/min o igual a $22,10^{-4}$ UpH/min o está comprendida entre $1,10^{-4}$ y $20,10^{-4}$, entre $2,10^{-4}$ y $22,10^{-4}$, entre $2,10^{-4}$ y $20,10^{-4}$, entre $5,10^{-4}$ y $20,10^{-4}$ o entre $10,10^{-4}$ y $18,10^{-4}$ UpH; y/o

b) una relación de (1) velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 a (2) velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30, que es inferior o igual a 25 %, o inferior o igual a 20 %, inferior o igual a 18 %, o está comprendida entre 1 y 25 %, entre 2 y 25 %, entre 5 y 18 %, entre 8 y 18 % o entre 10 y 18 %, en la que preferentemente la velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 y la velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 se calculan como se describe en el Ensayo I.

Por una "una cepa mutante de la cepa DSM 27029, de la cepa DSM 27030, o la cepa DSM 27031", significa una cepa de *S. thermophilus* cuyo genoma es muy similar al genoma de la cepa DSM 27029, de la cepa DSM 27030, o de la cepa DSM 27031. En la presente solicitud, dichos mutantes están abarcados en la expresión "cepa de *S. thermophilus* de la invención". La alta similitud en términos de genoma abarca:

- una cepa de *S. thermophilus*, cuyo genoma contiene como máximo 150 eventos mutacionales en comparación con el genoma de la cepa DSM 27029, de la cepa DSM 27030, o la cepa DSM 27031, preferentemente como máximo 140, como máximo 130, como máximo 120, como máximo 110, como máximo 100, 90, como máximo 80, como máximo 70, como máximo 60, como máximo 50, como máximo 40, como máximo 30 o como máximo 20 eventos mutacionales. Un evento mutacional se define como un SNP (por sus siglas en inglés) (polimorfismo de nucleótido sencillo) o un INDEL (por sus siglas en inglés) (inserción, delección, y combinaciones de los mismos). El número de eventos mutacionales se determina identificando los eventos mutacionales presentes en el genoma mutante, en comparación con el genoma de la cepa DSM 27029, de la cepa DSM 27030, o la cepa DSM 27031, representando cada evento mutacional (SNP o INDEL) 1 evento mutacional (es decir, que por ejemplo una inserción de una secuencia de diversos nucleótidos es considerada como un evento mutacional). En este contexto, la secuencia genómica de un mutante de la invención, definida por una serie de eventos mutacionales en comparación con la cepa DSM 27029, la cepa DSM 27030, o la cepa DSM 27031, también se define adicionalmente por su porcentaje de identidad con la secuencia genómica de la cepa DSM 27029, de la cepa DSM 27030, o la cepa DSM 27031, en la que el porcentaje de identidad representa en la presente memoria el porcentaje de la secuencia genómica presente en una cepa y encontrada en la otra, en particular a) el porcentaje de las secuencias presentes en el genoma de la cepa mutante y encontradas en el genoma de la cepa DSM 27029, de la cepa DSM 27030, o de la cepa DSM 27031, o b) el porcentaje de las secuencias presentes en el genoma de la cepa DSM 27029, de la cepa DSM 27030, o de la cepa DSM 27031, y encontradas en la secuencia genómica de la cepa mutante. Por consiguiente, una cepa mutante, que difiere de la cepa DSM 27029, la cepa DSM 27030, o la cepa DSM 27031 solo por inserción(es) o solo por delección(es) tiene un genoma 100 % idéntico al del genoma de la cepa DSM 27029, la cepa DSM 27030, o la cepa DSM 27031, puesto que la secuencia genómica completa de una cepa se encuentra totalmente en la secuencia genómica de la otra. En una realización particular, la secuencia genómica del mutante de la invención, definida por una serie de eventos mutacionales, tiene una identidad de al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,1 %, al menos 99,2 %, al menos 99,3 %, al menos 99,4 %, al menos 99,5 %, al menos 99,6 %, al menos 99,7 %, al menos 99,8 %, al menos 99,9 %, al menos 99,92 %, al menos 99,94 %, al menos 99,96 %, al menos 99,98 % o al menos 99,99 % con la secuencia genómica de la cepa DSM 27029, de la cepa DSM 27030, o la cepa DSM 27031, en la que el porcentaje de identidad representa el porcentaje de la secuencia genómica presente en una cepa y encontrada en la otra; y/o

- una cepa de *S. thermophilus*, cuya secuencia genómica tiene una identidad de al menos 95 %, con la secuencia genómica de la cepa DSM 27029, de la cepa DSM 27030, o la cepa DSM 27031, en particular una identidad de al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 95 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,1 %, al menos 99,2 %, al menos 99,3 %, al menos 99,4 %, al menos 99,5 %, al menos 99,6 %, al menos 99,7 %, al menos 99,8 %, al menos 99,9 %, al menos 99,92 %, al menos 99,94 %, al menos 99,96 %, al menos 99,98 % o al menos 99,99 % con la secuencia genómica de la cepa DSM 27029, la cepa DSM 27030, o la cepa DSM 27031 como se deposita el 21 de marzo de 2013. La identidad se describe comparando las dos secuencias genómicas sobre su longitud completa (alineamiento global), y puede calcularse utilizando cualquier programa basado en el algoritmo Needleman-Wunsch.

Cabe destacar que la cepa DSM 27029, la cepa DSM 27030, y la cepa DSM 27031 son mutantes de la otra, según las definiciones dadas anteriormente.

En una realización particular, el genoma de dicha cepa mutante comprende al menos un elemento seleccionado entre el grupo que consiste en un locus CRISPR4, un locus CRISPR1, y un locus CRISPR3 como se han definido anteriormente, en particular comprende uno, dos o tres elementos seleccionados entre este grupo.

5 En una realización particular, la invención proporciona una cepa mutante de *S. thermophilus* de la cepa DSM 27029, de la cepa DSM 27030, o de la cepa DSM 27031 como se define en la presente memoria, en la que el genoma de este mutante se diferencia del genoma de la cepa DSM 27029, la cepa DSM 27030, o la cepa DSM 27031 por su locus CRISPR4, su locus CRISPR1 y/o su locus CRISPR3, en particular por su locus CRISPR4, en particular por su locus CRISPR1, en particular por su locus CRISPR3, en particular por su locus CRISPR4 y su locus CRISPR1, en particular por su locus CRISPR1 y su locus CRISPR3, en particular por su locus CRISPR4 y su locus CRISPR3, y en particular por su locus CRISPR4, su locus CRISPR1 y su locus CRISPR3. Dichos mutantes, que difieren en uno o varios loci CRISPR (CRISPR1 y/o CRISPR3 y/o CRISPR4), se definen en la presente memoria como mutantes de CRISPR de la cepa DSM 27029, de la cepa DSM 27030, o de la cepa DSM 27031.

15 En una realización particular, un mutante de *S. thermophilus* de la cepa DSM 27029, de la cepa DSM 27030, o la cepa DSM 27031, en particular un mutante CRISPR de la cepa DSM 27029, de la cepa DSM 27030, o la cepa DSM 27031, se caracteriza por:

- un locus CRISPR4, que comprende la secuencia que se define en SEQ ID NO: 3 o que comprende parte(s) de SEQ ID NO: 3, tal como se define en cualquier realización descrita anteriormente; y/o
- un locus CRISPR1, que comprende la secuencia que se define en SEQ ID NO: 19 o que comprende parte(s) de SEQ ID NO: 19, tal como se define en cualquier realización descrita anteriormente. En una realización particular, el locus CRISPR1 de este mutante consiste en, de 5' a 3', al menos una unidad [repetición-espaciador] CRISPR1 adicional de la secuencia R1-X1, en particular al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más unidades [repetición-espaciador] CRISPR1 adicionales de la secuencia R1-X1 y la SEQ ID NO: 19 (en la que R1 es como se define en la SEQ ID NO: 20, y X1 es cualquier secuencia con una longitud de 27 a 33 pb, en particular de 28 a 32 pb, en particular de 29 a 31 pb, y en particular exactamente 30) pb. En otra realización particular, el locus CRISPR1 de este mutante consiste en, de 5' a 3', al menos una unidad [repetición-espaciador] CRISPR1 adicional de la secuencia R1X1, en particular al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más unidades [repetición-espaciador] CRISPR1 adicionales de la secuencia R1-X1, al menos 3 unidades consecutivas, en particular al menos 3 unidades [repetición-espaciador] CRISPR1 consecutivas contenidas en la SEQ ID NO: 19 (parte de SEQ ID NO: 19), y la repetición terminal de SEQ ID NO: 21. y/o
- un locus CRISPR3, que comprende la secuencia que se define en SEQ ID NO: 73 o que comprende parte(s) de SEQ ID NO: 73, tal como se define en cualquier realización descrita anteriormente. En una realización particular, el locus CRISPR3 de este mutante consiste en, de 5' a 3', al menos una unidad [repetición-espaciador] CRISPR1 adicional de la secuencia R3-X3, en particular al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 adicionales de la secuencia R3-X3 y la SEQ ID NO: 73 (en la que R3 es como se define en la SEQ ID NO: 74, y X3 es cualquier secuencia con una longitud de 27 a 33 pb, en particular de 28 a 32 pb, en particular de 29 a 31 pb, y en particular exactamente 30) pb. En otra realización particular, el locus CRISPR3 de este mutante consiste en, de 5' a 3', al menos una unidad [repetición-espaciador] CRISPR3 adicional de la secuencia R3-X3, en particular al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 adicionales de la secuencia R3-X3, al menos 3 unidades consecutivas, en particular al menos 3 unidades [repetición-espaciador] CRISPR3 consecutivas contenidas en la SEQ ID NO: 73 (parte de SEQ ID NO: 73), y la repetición terminal de SEQ ID NO: 74.

La invención también proporciona una composición de la invención que comprende o que consiste en un cultivo de una cepa de *Streptococcus thermophilus* de la invención, en particular que comprende o que consiste en un cultivo de la cepa de *Streptococcus thermophilus* DSM 27029, un cultivo de la cepa de *Streptococcus thermophilus* DSM 27030, o un cultivo de la cepa de *Streptococcus thermophilus* DSM 27031, en particular que comprende o que consiste en un cultivo de la cepa de *Streptococcus thermophilus* como se ha definido anteriormente.

La composición de la invención, preferentemente cuando se utiliza como un cultivo iniciador, puede ser un cultivo puro o un cultivo mixto. Por consiguiente, un cultivo puro se define como un cultivo en el que todo o esencialmente todo el cultivo consiste en la misma cepa de *Streptococcus thermophilus* de la invención. Como alternativa, un cultivo mixto se define como un cultivo que comprende diversos microorganismos, en particular que comprende diversas cepas bacterianas, incluyendo la cepa de *Streptococcus thermophilus* de la invención.

En una realización particular, la composición de la invención es o consiste en un cultivo puro de una cepa de *Streptococcus thermophilus* como se define en la presente memoria.

En otra realización, la composición de la invención comprende, además de un cultivo de *Streptococcus thermophilus* de la invención, al menos otro microorganismo. El término "microorganismo" se define en la presente memoria como cualquier organismo que se puede combinar con *Streptococcus thermophilus* de la invención, en particular para su uso en la preparación de productos según la invención. El término "microorganismo" abarca levaduras, mohos y bacterias, tales como especies bacterianas del ácido láctico, especies de *Bifidobacterium*, especies de *Brevibacterium*, y/o especies de *Propionibacterium*.

En una realización particular de cultivo mixto, la composición comprende, además de un cultivo de *Streptococcus thermophilus* de la invención, al menos un cultivo de bacterias del ácido láctico y/o al menos otro cultivo de bacterias propiónicas. Bacterias del ácido láctico adecuadas incluyen cepas de una especie de *Lactococcus*, una especie de *Streptococcus*, una especie de *Lactobacillus* que incluye *Lactobacillus acidophilus*, una especie *Enterococcus*, una especie *Pediococcus*, una especie *Leuconostoc*, y una especie *Oenococcus* o cualquier combinación de las mismas. Las especies de *Lactococcus* incluyen *Lactococcus lactis*, incluyendo *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*, *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* biovar *diacetylactis*, y *Lactococcus lactis* subespecie *cremoris*. Otras especies bacterianas del ácido láctico incluyen *Leuconostoc sp.*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subespecies *bulgaricus* y *Lactobacillus helveticus*.

Por consiguiente, la invención se dirige también, como realización particular, a una composición como se define en la presente memoria que comprende o que consiste en un cultivo de *Streptococcus thermophilus* de la invención, al menos o exactamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 cepas de la especie *Streptococcus thermophilus*, diferentes de la cepa de *S. thermophilus* de la invención, y/o una cepa de la especie *Lactobacillus*, y/o cualquier combinación de las mismas.

En una realización particular, la composición comprende o consiste en un cultivo de *Streptococcus thermophilus* de la invención, al menos una, en particular al menos o exactamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 cepas de la especie *Streptococcus thermophilus*, diferente de la cepa de *S. thermophilus* de la invención, y/o una o varias cepas de la especie *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, y/o una o varias cepas de la especie *Lactobacillus helveticus* y/o cualquier combinación de las mismas. En una realización particular, la composición comprende o consiste en un cultivo de *Streptococcus thermophilus* de la invención, una cepa de la especie de *Streptococcus thermophilus*, diferente de la cepa de *S. thermophilus* de la invención, y una cepa de la especie *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*. En otra realización particular, la composición comprende o consiste en un cultivo de *Streptococcus thermophilus* de la invención, dos cepas de la especie de *Streptococcus thermophilus*, diferentes de la cepa de *S. thermophilus* de la invención, y una cepa de la especie *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*.

En una realización particular, la composición comprende o consiste en un cultivo de *Streptococcus thermophilus* de la invención, *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* y/o *Lactococcus lactis* subespecie *cremoris*.

En una realización particular, la composición comprende o consiste en un cultivo de *Streptococcus thermophilus* de la invención y un cultivo iniciador mixto complejo.

En una realización particular de cualquier composición definida en la presente memoria, ya sea como un cultivo puro o mixto, la composición comprende además al menos una cepa probiótica tal como *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, o *Lactobacillus casei*.

En una realización particular, la composición como se define en la presente memoria, ya sea como un cultivo puro o mixto como se ha definido anteriormente, comprende además, en particular componente(s) aceptable(s) desde el punto de vista alimenticio, tales como, pero no limitados a, agentes crioprotectores (o crioprotectores), agentes de refuerzo y/o aditivos comunes. Por "componente", significa cualquier molécula o solución que no es un microorganismo como se ha definido anteriormente. A modo de ejemplo, los agentes crioprotectores incluyen, ciclodextrina, maltitol, trehalosa, sacarosa, maltodextrina o combinaciones de los mismos. A modo de ejemplo, los agentes de refuerzo incluyen nucleótidos. A modo de ejemplo, los aditivos comunes incluyen nutrientes tales como extractos de levadura, azúcares, y vitaminas.

En una realización particular, la composición como se define en la presente memoria, ya sea como un cultivo puro o mixto como se ha definido anteriormente, con o sin componente(s) adicional(es) se encuentra en una forma líquida, congelada, o secada en polvo, tal como el que se obtiene tras la liofilización.

En una realización particular, la composición de la invención, ya sea como un cultivo puro o mixto como se ha definido anteriormente, con o sin componente(s) adicional(es), comprende la cepa de *S. thermophilus* de la invención (y opcionalmente al menos otro microorganismo) en una forma concentrada (concentrado), incluyendo concentrados congelados o secos. Por consiguiente, la concentración de la cepa de *S. thermophilus* de la invención en la composición está en el intervalo de 10^5 a 10^{12} UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de la composición, preferentemente 10^7 a 10^{12} UFC, y más preferentemente al menos 10^7 , al menos 10^8 , al menos 10^9 , al menos 10^{10} o al menos 10^{11} UFC/g de la composición.

La invención también proporciona el uso de un cultivo de una cepa de *Streptococcus thermophilus* de la invención o el uso de una composición como se define en la presente memoria, para preparar productos, en particular productos alimenticios para seres humanos o para animales, en particular productos fermentados, en particular productos alimenticios fermentados para seres humanos o productos alimenticios fermentados para animales. Por consiguiente, la invención también proporciona un método para la preparación de un producto, preferentemente un producto alimenticio para seres humanos o para animales, en el que dicho método comprende a) adición de un cultivo de la cepa de *S. thermophilus* o una composición de la invención en un sustrato, b) opcionalmente fermentación de dicho

5 sustrato, y c) obtención de dicho producto. En una realización particular, la invención también proporciona un método para la preparación de un producto fermentado, preferentemente un producto alimenticio fermentado para seres humanos o para animales, en el que dicho método comprende fermentar un sustrato con o en presencia de un cultivo de la cepa *S. thermophilus* de la invención o una composición como se define en la presente memoria, y obtener dicho producto fermentado.

10 La invención también va dirigida a una cualquier producto, que se prepara a partir de una cepa de *S. thermophilus* de la invención o una composición como se define en la presente memoria, en particular por los métodos desvelados en la presente memoria, o que contiene o comprende una cepa de *S. thermophilus* de la invención o una composición como se define en la presente memoria. En una realización particular, la invención proporciona un producto, en particular un producto alimenticio para seres humanos o para animales, en particular un producto fermentado, en particular un producto alimenticio fermentado para seres humanos o un producto alimenticio fermentado para animales, obtenible u obtenido por métodos como se describe en la presente memoria. La invención también proporciona un producto, en particular un producto alimenticio para seres humanos o para animales, en particular un producto fermentado, en particular un producto alimenticio fermentado para seres humanos o un producto alimenticio fermentado para animales, que comprende un cultivo de la cepa de *S. thermophilus* de la invención o que comprende una composición como se define en la presente memoria.

20 Los productos adecuados incluyen, aunque sin limitación, un alimento, un producto alimenticio, un ingrediente alimentario, un aditivo alimentario, un suplemento alimenticio, un alimento funcional, un pienso, un suplemento nutricional, o un suplemento probiótico. Según la invención, por "*alimento*" se entiende un producto que se destina al consumo humano. Según la invención, por "*pienso*" se entiende un producto que se destina a alimentar un animal. Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*ingrediente alimentario*" incluye una formulación, que es o puede ser añadida a alimentos e incluye formulaciones que se pueden utilizar a niveles bajos en una amplia variedad de productos que requieren, por ejemplo, acidificación. Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*alimento funcional*" significa un alimento que es capaz de proporcionar no solo un efecto nutricional y/o satisfacción con el gusto, sino que también es capaz de dar un efecto beneficioso adicional al consumidor. Los productos adecuados incluyen, aunque sin limitación, frutas, hortalizas, cultivos forrajeros y hortalizas que incluyen productos derivados, cereales y productos derivados de cereales, productos lácteos y productos derivados de productos lácteos, carne, aves de corral, y mariscos. La cepa de *S. thermophilus* de la invención o una composición como se define en la presente memoria puede utilizarse en la preparación de productos alimenticios tales como uno o más de los productos de confitería, productos lácteos, productos cárnicos, productos avícolas, productos de pescado y productos de pastelería. A modo de ejemplo, la cepa de *S. thermophilus* de la invención o una composición como se define en la presente memoria puede utilizarse como ingredientes para un refresco, un zumo de frutas o una bebida que comprende seroproteína, té saludable, bebida de cacao, bebida de leche y bebida con bacterias del ácido láctico, yogur, yogur bebible, y vino.

40 En una realización particular, el sustrato en el que se añade la cepa de *S. thermophilus* de la invención o una composición como se define en la presente memoria a un sustrato de leche. Por lo tanto, en una realización particular, la invención también proporciona el uso de un cultivo de una cepa de *Streptococcus thermophilus* de la invención o el uso de una composición como se define en la presente memoria, para la preparación de un producto lácteo, en particular un producto alimenticio lácteo para seres humanos o un producto alimenticio lácteo para animales, en particular un producto lácteo fermentado, en particular un producto alimenticio lácteo fermentado para seres humanos o un producto alimenticio lácteo fermentado para animales. Por consiguiente, la invención también proporciona un método para la preparación de un producto lácteo, en particular un producto alimenticio lácteo para seres humanos o un producto alimenticio lácteo para animales, en particular un producto lácteo fermentado, en particular un producto alimenticio lácteo fermentado para seres humanos o un producto alimenticio lácteo fermentado para animales, en el que dicho método comprende a) poner en contacto un sustrato a base de leche con o en presencia de un cultivo de la cepa *S. thermophilus* de la invención o con una composición como se define en la presente memoria, b) opcionalmente fermentar dicho sustrato a base de leche y c) obtener dicho producto. En una realización particular, la invención también proporciona un método para la preparación de un producto lácteo fermentado, preferentemente un producto alimenticio fermentado para seres humanos o un producto alimenticio fermentado para animales, en el que dicho método comprende fermentar un sustrato a base de leche con o en presencia de un cultivo de la cepa *S. thermophilus* de la invención o una composición como se define en la presente memoria, y obtener dicho producto lácteo fermentado. En una realización particular, el sustrato a base de leche comprende artículos sólidos, tales como frutas, productos a base de chocolate, o cereales. En una realización particular, la invención también se dirige al uso de la cepa de *S. thermophilus* de la invención o cualquier composición como se define en la presente memoria (cultivo puro o mixto) para reducir el fenómeno de post-acidificación del producto lácteo obtenido con o del producto lácteo fermentado con o en presencia de dicha cepa de *S. thermophilus* o dicha composición, en comparación con el(los) producto(s) lácteo(s) obtenido(s) sin o fermentado(s) sin o en ausencia de la cepa de *S. thermophilus* de la invención, y dirigida a los productos lácteos per se. En una realización particular, la invención se dirige también al uso de la cepa de *S. thermophilus* de la invención o cualquier composición como se define en la presente memoria (cultivo puro o mixto) para obtener un producto lácteo, en particular un yogur, cuyo pH es $4,4 \pm 0,1$ y es estable cuando el producto lácteo se almacena durante 14 días a una temperatura positiva inferior a 10 °C. En una realización particular, la invención se dirige también al uso de la cepa de *S. thermophilus* de la invención o cualquier composición como se define en la presente memoria (cultivo puro o mixto) para obtener un producto lácteo, en particular un yogur, cuyo pH

es $4,5 \pm 0,1$ o es $4,4 \pm 0,05$ cuando el producto lácteo se almacena durante 14 días a una temperatura positiva inferior a $10\text{ }^\circ\text{C}$, y opcionalmente cuyo pH es estable (es decir, en el mismo intervalo) hasta 28 días.

Por "*sustrato a base de leche*", se refiere a leche de origen animal y/o vegetal. En una realización particular, el sustrato de leche es de origen animal, tal como vaca, cabra, oveja, búfalo, cebra, caballo, burro, o camello, y similares. La leche puede estar en el estado nativo, una leche reconstituida, una leche desnatada, o una leche suplementada con compuestos necesarios para el crecimiento de las bacterias o para el posterior procesamiento de leche fermentada, tal como grasas, proteínas de un extracto de levadura, peptona y/o un tensioactivo, por ejemplo. En una realización particular, el sustrato de leche es leche UHT comercial (tratamiento a ultra alta temperatura, es decir, $130\text{ }^\circ\text{C}$ durante unos pocos segundos), en particular suplementada con 3 % (p/p) de leche semidesnatada en polvo, y pasteurizada por calentamiento, en particular durante 10 ± 1 min a $90 \pm 0,2\text{ }^\circ\text{C}$. En otra realización, el sustrato de leche es de origen vegetal, es decir, procede de extractos de una materia vegetal que se ha tratado o de otra manera (leche vegetal), tal como procedente de plantas leguminosas (soja, garbanzos, lentejas y similares) o de las semillas oleaginosas (colza, soja, sésamo, algodón y similares), cuyo extracto contiene proteínas en solución o en suspensión coloidal, que son coagulables por la acción química, por fermentación ácida, y/o por calor. En otra realización, el sustrato a base de leche es una mezcla de leche animal y de leche vegetal como se ha definido anteriormente.

Por lo tanto, la invención proporciona un producto lácteo, en particular un producto alimenticio lácteo para seres humanos o un producto alimenticio lácteo para animales, en particular un producto lácteo fermentado, en particular un producto alimenticio lácteo fermentado para seres humanos o un producto alimenticio lácteo fermentado para animales, obtenible u obtenido por métodos como se describe en la presente memoria con un sustrato a base de leche. La invención también proporciona un producto lácteo, en particular un producto lácteo fermentado que comprende un cultivo de la cepa de *S. thermophilus* de la invención o que comprende una composición como se define en la presente memoria. En una realización particular, el producto lácteo o el producto lácteo fermentado es o comprende yogur, queso (tal como queso de leche cuajada ácido, queso curado, queso semicurado, requesón), suero de leche, cuajada, crema agria, kéfir, una bebida fermentada a base de suero de leche, leche fermentada de yegua, una bebida a base de leche, una bebida de yogur, leche fermentada, nata madurada, queso fresco, leche, un retentado de producto lácteo, un queso elaborado, requesón, un postre de crema, o leche para lactantes, preferentemente basándose en un sustrato a base de leche de origen animal y/o vegetal.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

EJEMPLO 1

Cálculo de la velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 (S1), velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 (S2) y relación de S2/S1

Ensayo I

Leche de vaca UHT semidesnatada comercial (1,5 % de materias grasas en p/p) ["Le Petit Vendéen"; GLAC - Francia] que es suplementada con 3 % (P/P) de leche desnatada en polvo. Después de la disolución, la mezcla es tratada térmicamente a $90\text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min. La etapa de calentamiento de $20\text{-}25\text{ }^\circ\text{C}$ a $90\text{ }^\circ\text{C}$ no se prolongará más de 35 min y la etapa de enfriamiento de $90\text{ }^\circ\text{C}$ a $35\text{ }^\circ\text{C}$ - $45\text{ }^\circ\text{C}$ no se prolongará más de 45 min. Justo antes de la inoculación, se añade 1 g/100 l (p/v) de formiato de sodio. La inoculación se lleva a cabo con cepas conservadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ en un medio a base de leche. La tasa de inoculación es $1,10^6$ UFC/ml de base de leche. La temperatura de incubación se establece en $43\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$, y se mantiene constante en un baño de agua durante la fermentación. Un sistema Cinac (CINAC, un sistema automatizado para el control de fermentos lácticos; Corrieu G, Picque D, Perret B, Quemener P; Process Magazine; 1992; n.º 1068; págs. 24-27) se utilizó para la medición en línea del cambio del pH. El pH es registrado cada 5 min durante 24 h, y resumido en una tabla o presentado como una curva CINAC.

Se determinaron los 3 siguientes parámetros: tiempo para pH = 6,00 ($T_{\text{pH}6,00}$), tiempo para pH = 5,30 ($T_{\text{pH}5,30}$) y tiempo para pH = 5,00 ($T_{\text{pH}5,00}$). Estos parámetros son obtenidos directamente por el registro en línea, o cuando el tiempo para obtener el pH objetivo no está presente en la tabla, se realiza una interpolación lineal entre los dos datos registrados (véase el ejemplo con la cepa DGCC7984 a continuación).

Por último, se determinaron los siguientes parámetros, para describir la cinética de acidificación de la leche:

- $S_1 = (6,00 - 5,30) / (T_{\text{pH}5,30} - T_{\text{pH}6,00})$ (UpH/min) [velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30];
- $S_2 = (5,30 - 5,00) / (T_{\text{pH}5,00} - T_{\text{pH}5,30})$ (UpH/min) [velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00]; y
- la relación de S2 a S1 [relación S2/S1] (en porcentaje).

Implementación en la cepa DGCC7984

El Ensayo I (como se ha descrito anteriormente) se ha implementado en la cepa DGCC7984. El pH, registrado cada 5 min durante 24 h, se desvela en la Tabla 1.

ES 2 727 670 T3

Se determinaron los 3 parámetros, 1) tiempo para pH = 6,00 ($T_{pH6,00}$), 2) tiempo para pH = 5,30 ($T_{pH5,30}$), y 3) tiempo para pH = 5,00 ($T_{pH5,00}$).

5 Por consiguiente, el tiempo para pH = 5,30 se ha obtenido directamente por el registro en línea (235 min). Dado que el tiempo para pH = 6,00 y el tiempo para pH = 5,00 ($T_{pH5,00}$) no se han encontrado en la Tabla, se realizó una interpolación lineal entre los dos datos registrados circundantes a pH = 6,00 y los dos datos registrados circundantes a pH = 5,00, por el método de la siguiente manera (aquí se encuentra el ejemplo para la evaluación de $T_{pH6,00}$). El mismo modo de cálculo se utiliza para la evaluación de $T_{pH5,00}$.

10
$$- T_{pH6,00} = (6,00 - pH_1 + T_1 * ((pH_1 - pH_2)/(T_1 - T_2))) / ((pH_1 - pH_2) / (T_1 - T_2))$$

En el ejemplo, $T_1 = 175$ min para $pH_1 = 6,04$, y $T_2 = 180$ min para $pH_2 = 5,99$

$$T_{pH6,00} = (6,00 - 6,04 + 175 * ((6,04 - 5,99)/(175 - 180))) / ((6,04 - 5,99)/(175 - 180))$$

15
$$T_{pH6,00} = (6,00 - 6,04 + 175 * ((0,05/5))) / (0,05/5)$$

$$T_{pH6,00} = 0,04 + (175 * 0,01)/0,01 = 179 \text{ min.}$$

Tiempo (min)	pH	Tiempo (min)	pH	Tiempo (min)	pH	Tiempo (min)	pH	Tiempo (min)	pH	Tiempo (min)	pH	Tiempo (min)	pH
0	6,45	210	5,59	420	4,63	630	4,41	840	4,31	1050	4,27	1260	4,24
5	6,44	215	5,52	425	4,62	635	4,41	845	4,31	1055	4,27	1265	4,24
10	6,44	220	5,46	430	4,61	640	4,40	850	4,31	1060	4,27	1270	4,24
15	6,43	225	5,40	435	4,60	645	4,40	855	4,31	1065	4,26	1275	4,23
20	6,42	230	5,35	440	4,60	650	4,40	860	4,31	1070	4,26	1280	4,23
25	6,42	235	5,30	445	4,59	655	4,39	865	4,31	1075	4,26	1285	4,23
30	6,41	240	5,25	450	4,58	660	4,39	870	4,31	1080	4,26	1290	4,23
35	6,41	245	5,21	455	4,58	665	4,39	875	4,30	1085	4,26	1295	4,23
40	6,41	250	5,18	460	4,57	670	4,38	880	4,30	1090	4,26	1300	4,23
45	6,41	255	5,14	465	4,56	675	4,38	885	4,30	1095	4,26	1305	4,23
50	6,41	260	5,11	470	4,56	680	4,38	890	4,30	1100	4,26	1310	4,23
55	6,41	265	5,08	475	4,55	685	4,38	895	4,30	1105	4,26	1315	4,23
60	6,40	270	5,06	480	4,54	690	4,37	900	4,30	1110	4,26	1320	4,23
65	6,40	275	5,03	485	4,54	695	4,37	905	4,30	1115	4,26	1325	4,23
70	6,39	280	5,01	490	4,53	700	4,37	910	4,30	1120	4,26	1330	4,23
75	6,39	285	4,99	495	4,53	705	4,37	915	4,30	1125	4,25	1335	4,23
80	6,38	290	4,97	500	4,52	710	4,36	920	4,29	1130	4,25	1340	4,23
85	6,37	295	4,95	505	4,51	715	4,36	925	4,29	1135	4,25	1345	4,23
90	6,36	300	4,93	510	4,51	720	4,36	930	4,29	1140	4,25	1350	4,23
95	6,35	305	4,91	515	4,50	725	4,36	935	4,29	1145	4,25	1355	4,23
100	6,33	310	4,89	520	4,50	730	4,35	940	4,29	1150	4,25	1360	4,23
105	6,32	315	4,87	525	4,49	735	4,35	945	4,29	1155	4,25	1365	4,22
110	6,30	320	4,86	530	4,49	740	4,35	950	4,29	1160	4,25	1370	4,22
115	6,29	325	4,84	535	4,48	745	4,35	955	4,29	1165	4,25	1375	4,22
120	6,27	330	4,82	540	4,48	750	4,35	960	4,28	1170	4,25	1380	4,22
125	6,25	335	4,81	545	4,48	755	4,34	965	4,28	1175	4,25	1385	4,22
130	6,24	340	4,80	550	4,47	760	4,34	970	4,28	1180	4,25	1390	4,22
135	6,22	345	4,78	555	4,47	765	4,34	975	4,28	1185	4,25	1395	4,22
140	6,21	350	4,77	560	4,46	770	4,34	980	4,28	1190	4,24	1400	4,22
145	6,19	355	4,76	565	4,46	775	4,34	985	4,28	1195	4,24	1405	4,22

ES 2 727 670 T3

Tiempo (min)	pH	Tiempo (min)	pH	Tiempo (min)	pH	Tiempo (min)	pH	Tiempo (min)	pH	Tiempo (min)	pH	Tiempo (min)	pH
150	6,18	360	4,75	570	4,45	780	4,33	990	4,28	1200	4,24	1410	4,22
155	6,16	365	4,73	575	4,45	785	4	995	4,28	1205	4,24	1415	4,22
160	6,14	370	4,72	580	4,45	790	4,33	1000	4,28	1210	4,24	1420	4,22
165	6,11	375	4,71	585	4,44	795	4,33	1005	4,28	1215	4,24	1425	4,22
170	6,08	380	4,70	590	4,44	800	4,33	1010	4,27	1220	4,24	1430	4,22
175	6,04	385	4,69	595	4,43	805	4,33	1015	4,27	1225	4,24	1435	4,22
180	5,99	390	4,68	600	4,43	810	4,32	1020	4,27	1230	4,24	1440	4,22
185	5,93	395	4,67	605	4,43	815	4,32	1025	4,27	1235	4,24		
190	5,87	400	4,66	610	4,42	820	4,32	1030	4,27	1240	4,24		
195	5,80	405	4,65	615	4,42	825	4,32	1035	4,27	1245	4,24		
200	5,73	410	4,65	620	4,42	830	4,32	1040	4,27	1250	4,24		
205	5,66	415	4,64	625	4,41	835	4,32	1045	4,27	1255	4,24		

Tabla 1

Por último, S1, S2, y la relación S2/S1 para la cepa DGCC7984 se han calculado y se notifican en la Tabla 2:

Tabla 2

T _{pH6,00} (min)	179
T _{pH5,30} (min)	235
T _{pH5,00} (min)	282,5
S ₁ = (6,00-5,30)/(T _{pH5,30} - T _{pH6,00}) (UpH/min.)	0,0125
S ₂ = (5,30-5,00)/(T _{pH5,00} - T _{pH5,30}) (UpH/min.)	0,0063
R (%)	50

EJEMPLO 2

5

Determinación de S1, S2, y relación S2/S1 para 69 cepas de *Streptococcus thermophilus*

Cepas

10 Se han utilizado 69 cepas de *Streptococcus thermophilus* de Dupont Collection. De estas 69 cepas, se desvelaron previamente 7 cepas de *S. thermophilus* en las solicitudes de patente y se depositaron ante el C.N.C.M., y 2 cepas de *S. thermophilus* tienen su secuencia genómica disponible en la base de datos del NCBI.

La información acerca de estas 9 cepas se resume a continuación:

15

(1) cepa DGCC 7809: depositada ante el C.N.C.M, con el número 1-2425

(2) cepa DGCC7710: depositada ante el C.N.C.M, con el número 1-2423

(3) cepa DGCC8014: depositada ante el C.N.C.M, con el número 1-3617

(4) cepa DGCC7984: depositada ante el C.N.C.M, con el número 1-2980

20

(5) cepa DGCC7666: depositada ante el C.N.C.M, con el número 1-3782

(6) cepa DGCC7681: depositada ante el C.N.C.M, con el número 1-2432

(7) cepa DGCC7891: depositada ante el C.N.C.M, con el número 1-2429

(8) cepa DGCC3198: LMD-9, secuencia genómica disponible en NCBI, n.º de acceso NC_008532.1

(9) cepa DGCC9742: LMG 18311, secuencia genómica disponible en NCBI, n.º de acceso NC_006448.1

25

En la presente memoria, los números de DGCC son referencias internas a la colección de Dupont; los números de DSM y CNCM son los números asignados respectivamente por Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH, y la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (París, Francia), a consecuencia del depósito en virtud del Tratado de Budapest.

30

Determinación de S1, S2, y relación S2/S1 para 69 cepas de Streptococcus thermophilus

El Ensayo I (como se ha descrito anteriormente) se ha implementado en las 69 cepas de *Streptococcus thermophilus*, y el valor de S1, el valor de S2 y la relación S2/S1 se calcularon como se ha descrito anteriormente.

5

Resultados y comentarios

La velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 (S1) y la velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 (S2) para las 69 cepas de *Streptococcus thermophilus* se determinó, y se calculó la relación S2/S1. Las 69 cepas de *Streptococcus thermophilus* han sido clasificadas a partir de los valores de S1 más pequeños a más grandes (Tabla 3).

10

Se puede observar que cuanto mayor es el valor S1 de una cepa de *S. thermophilus*, mayor es su valor S2. Brevemente, las cepas de *S. thermophilus* que tienen un valor S1 bajo (inferior a $70,10^{-4}$ UpH/min) tienen un valor S2 inferior a $30,10^{-4}$ UpH/min, y las cepas que tienen un valor S1 alto (al menos $70,10^{-4}$ UpH/min) tienen un valor S2 de al menos $35,10^{-4}$ UpH/min. Esto es claramente visible en la Figura 1 que representa el valor S2 de una cepa como una función de su valor S1 (diamantes grises).

15

Sorprendentemente, 3 cepas tienen una cinética de acidificación de la leche atípica, es decir, tienen un valor S1 alto (al menos $70,10^{-4}$ UpH/min), mientras que al mismo tiempo tienen un valor S2 inferior a $22,10^{-4}$ UpH/min (incluso inferior al valor S2 de algunas cepas que tienen un valor S1 bajo). Estas cepas, depositadas como la cepa DSM 27029, la cepa DSM 27030, o la cepa DSM 27031 [en virtud del Tratado de Budapest del 21 de marzo de 2013 ante Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH], presentan un valor S2 que no es vinculable al valor S1, como puede observarse en la Figura 1 (cuadrados negros).

20

Esta diferencia en la cinética de acidificación entre las cepas de *S. thermophilus* ensayadas también se pone de manifiesto al calcular la relación del valor S2 al valor S1 (en %). Por consiguiente, en general, las cepas de *S. thermophilus* que tienen un valor S1 bajo (inferior a $70,10^{-4}$ UpH/min) tienen una relación S2/S1 entre 30 y 50 %, y las cepas que tienen un valor S1 de al menos $70,10^{-4}$ UpH/min tienen una relación S2/S1 de al menos 45 y hasta 70 %.

25

Por el contrario, las 3 cepas DSM 27029, DSM 27030 y DSM 27031 tienen, a pesar de su alto valor S1 alto (al menos $70,10^{-4}$ UpH/min), una relación S2/S1 que es inferior a 25 %, es decir, que es la relación S2/S1 más baja de todas las cepas de *S. thermophilus* ensayadas. De manera más sorprendente, la relación S2/S1 de estas 3 cepas está comprendida entre dos veces menos y 6 veces menos la relación S2/S1 de las cepas de *S. thermophilus* que tienen un valor S1 de al menos $70,10^{-4}$ UpH/min.

30

Tabla 3: velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 [S1(6,0-5,3), en 10^{-4} UpH/min], velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 [S2(5,3-5,0) en 10^{-4} UpH/min] y relación S2/S1 (en %) para 69 cepas de *Streptococcus thermophilus*; clasificadas a partir de los valores S1 los más pequeños a los más grandes; ¹ a ⁹ para referirse a las cepas (1) a (9) analizadas anteriormente.

40

Ref	S1 (6,0-5,3)	S2 (5,3-5,0)	S2/S1(%)	ref	S1 (6,0-5,3)	S2 (5,3-5,0)	S2/S1(%)
DGCC2058	16	6	38	DSM27030	103	16	16
DGCC2141	25	9	36	DGCC8900	115	59	51
DGCC7785	30	10	34	DGCC8853	119	73	62
DGCC9742 ⁹	30	14	47	DGCC3198 ⁸	122	62	51
DGCC8178	30	13	42	DGCC1351	123	63	51
DGCC8400	33	12	37	DGCC7984 ⁴	125	63	50
DGCC7891 ⁷	34	13	39	DGCC8759	127	67	52
DGCC7722	35	14	39	DGCC8901	127	63	49
DGCC7666 ⁵	36	14	41	DGCC8771	130	73	56
DGCC8413	37	18	48	DGCC8009	135	91	68
DGCC7773	40	15	38	DGCC8776	135	77	57
DGCC7967	40	13	33	DGCC8773	135	70	52
DGCC938	40	15	38	DGCC8897	139	72	52
DGCC7681 ⁶	45	18	40	DGCC8857	140	70	50
DGCC7790	46	16	35	DGCC8787	141	86	61
DGCC47	46	13	27	DGCC8851	149	91	61
DGCC8836	49	16	33	DGCC8905	152	86	56
DGCC7873	52	21	40	DGCC8833	156	81	52
DGCC8837	52	18	35	DGCC8782	159	97	61
DGCC757	53	30	57	DGCC2056	159	75	47

Ref	S1 (6,0-5,3)	S2 (5,3-5,0)	S2/S1(%)	ref	S1 (6,0-5,3)	S2 (5,3-5,0)	S2/S1(%)
DGCC7856	55	23	41	DGCC8904	159	75	47
DGCC2057	64	33	52	DGCC1974	163	79	48
DGCC7700	64	29	45	DGCC8011	167	107	64
DGCC8854	70	43	61	DGCC8832	167	100	60
DGCC8849	74	24	33	DGCC8855	167	91	55
DGCC782	78	55	70	DGCC8906	171	107	63
DGCC8006	81	61	75	DGCC959	171	95	56
DGCC8014 ³	81	48	59	DGCC8835	175	120	69
DGCC7992	81	35	43	DGCC8751	175	86	49
DGCC7710 ²	93	56	60	DGCC7854	185	110	59
DGCC8846	93	46	49	DGCC7919	197	100	51
DSM27031	98	16	16	DGCC7796	201	106	53
DSM27029	98	11	11	DGCC8848	206	130	63
DGCC7809 ¹	102	65	64	DGCC8828	226	125	55
DGCC2062	103	57	55				

La velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 (S1), la velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 (S2) y la relación S2/S1 de estas 3 cepas se han comparado más específicamente con las otras 9 cepas de *S. thermophilus* identificadas bajo (1) a (9) anterior. Por consiguiente, la desvinculación entre los valores S2 y S1 así como la baja relación S2/S1 resultan claramente evidentes en las Figuras 2A y 2B en comparación con las otras 9 cepas.

Como consecuencia, estas 3 cepas presentan una cinética de acidificación de la leche con una baja relación S2/S1, en particular si se considera que su valor S1 es al menos $70,10^{-4}$ UpH/min.

EJEMPLO 3

Análisis genético de las cepas DSM 27029, DSM 27030 y DSM 27031, mutantes CRISPR, y determinación de S1, S2 y relación S2/S1

Análisis genético

Diversas regiones del genoma de las cepas DSM 27029, DSM 27030 y DSM 27031 han sido analizadas. Por consiguiente, se determinaron la secuencia del locus CRISPR4, la secuencia del locus CRISPR1, y la secuencia del locus CRISPR3.

En las 3 cepas depositadas ante el DSM, el locus CRISPR4 consiste en la secuencia que se define en la SEQ ID NO: 3 y comprende 12 unidades [repetición-espaciador] CRISPR4. Está flanqueada por el líder CRISPR4 como se define en la SEQ ID NO: 2 y el remolque CRISPR4 definido en la SEQ ID NO: 1.

En las 3 cepas depositadas ante el DSM, el locus CRISPR1 consiste en la secuencia que se define en la SEQ ID NO: 19 y comprende 32 unidades [repetición-espaciador] CRISPR1. Está flanqueada por el líder CRISPR1 como se define en la SEQ ID NO: 17 y el remolque CRISPR1 definido en la SEQ ID NO: 18.

En las 3 cepas depositadas ante el DSM, el locus CRISPR3 consiste en la secuencia que se define en la SEQ ID NO: 73 y comprende 12 unidades [repetición-espaciador] CRISPR3. Está flanqueada por el líder CRISPR3 como se define en la SEQ ID NO: 71 y el remolque CRISPR3 definido en la SEQ ID NO: 72.

Mutantes CRISPR

Se obtuvieron diversos mutantes CRISPR de las cepas depositadas. La exposición a fagos, descrita con detalle en la solicitud de patente WO2008/108989, se puede utilizar para obtener mutantes CRISPR de la invención.

Determinación de S1, S2, y relación S2/S1 de mutantes CRISPR

Como ejemplo de diversos mutantes CRISPR obtenidos, se caracterizaron dos mutantes CRISPR de la cepa DSM 27029, para su valor S1, valor S2 y relación S2/S1.

El primer mutante CRISPR DSM 27029 (DSM 27029 M1) tiene un valor S1 de $104,10^{-4}$ UpH/min, un valor S2 de $18,10^{-4}$ UpH/min y una relación S2/S1 de 17 %. El segundo mutante CRISPR DSM 27029 (DSM 27029 M2) tiene un valor S1 de $112,10^{-4}$ UpH/min, un valor S2 de $23,10^{-4}$ UpH/min y una relación S2/S1 de 20 %.

Estos datos confirman que los mutantes CRISPR conservan la cinética de acidificación de la leche (es decir, un valor S1 de al menos $70,10^{-4}$ UpH/min, un valor S2 inferior a $22,10^{-4}$ UpH/min, y/o una relación S2/S1 inferior a 25 %). Estos datos también confirman que los diferentes loci CRISPR como se define en la presente memoria, solos o en combinación, pueden guiar al experto en la materia en la identificación de cepas de *S. thermophilus* de la invención.

EJEMPLO 4

Preparación de leches fermentadas utilizando una cepa DSM 27029 *Preparación de leches fermentadas frescas*

Las leches fermentadas han sido preparadas según las siguientes condiciones experimentales:

Preparación de la base de leche: La leche UHT semidesnatada comercial (1,5 % de materias grasas en p/p) + 3 % de leche desnatada en polvo se trató térmicamente a 90 °C durante 10 min. Justo antes de la inoculación, se añadió 1 g/100 l (p/v) de formiato de sodio.

Inoculación: La inoculación se llevó a cabo con cepas conservadas a -80 °C en un medio a base de leche. La cepa DSM 27029 se combinó con una segunda cepa de *Streptococcus thermophilus*, DGCC2057, y una cepa perteneciente a *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, DGCC 10697. Las tasas de inoculación se ajustaron a $8,10^5$ UFC/ml, $2,10^5$ UFC/ml, y $1,10^4$ UFC/ml de base de leche, respectivamente. Se utilizó un fermento láctico YOMIX™ 465 LYO para referencia, y se inoculó a una dosificación comercial de 20 DCU/100 l.

Fermentación: La temperatura de incubación se estableció en 43 °C +/- 1 °C, y se mantuvo constante en un baño de agua durante la fermentación. Un sistema Cinac (CINAC, un sistema automatizado para el control de fermentos lácticos; Corrieu G, Picque D, Perret B, Quemener P; Process Magazine; 1992; n.º 1068; págs. 24-27) se utilizó para la medición en línea del cambio del pH. A pH 4,60 +/- 0,1, el producto fermentado se enfrió a 6 °C, y luego se almacenó a 6 °C. Se calculó el tiempo para alcanzar un pH de 4,60 (en el cual el producto se enfría de 43 °C a 6 °C).

Métodos de evaluación de las características de las leches fermentadas frescas.

La leche fermentada fresca puede describirse por sus atributos de sabor y textura. Esta evaluación se ha llevado a cabo tras el almacenamiento de las leches fermentadas frescas durante 14 días a 6 °C. Para la textura, se han utilizado herramientas reológicas. La viscosidad de la leche fermentada se midió utilizando un viscosímetro Brookfield (Brookfield Engineering laboratories, Inc.) equipado con un soporte de trayectoria helicoidal. Después, se han realizado las siguientes etapas.

- equipar dicho viscosímetro con un husillo de barra en T tipo C,
- rellenar un recipiente de cristal de 125 ml de yogur con la leche fermentada,
- introducir el recipiente de yogur lleno con la leche fermentada en el viscosímetro,
- aplicar una velocidad de 10 rpm al viscosímetro, y acto seguido
- leer, tras 30 segundos de rotación, la viscosidad de la muestra.

Además, se ha utilizado un reómetro extensional de ruptura de capilares (CaBER 1 de HAAKE, THERMO ELECTRON Corp.) para evaluar la extensibilidad de la leche fermentada fresca. El protocolo para evaluar el tiempo de ruptura se describe brevemente a continuación.

- calentar una muestra de la leche fermentada a 20 °C,
- romper y homogeneizar el gel por agitación 20 veces con una cuchara de plástico convencional,
- colocar 60 µl de la leche fermentada homogeneizada entre dos placas de un reómetro extensional de ruptura de capilares (CaBER 1 de HAAKE, THERMO ELECTRON Corp.) con los siguientes ajustes: diámetro de la placa: 6 mm; altura inicial: 2 mm; altura final: 9,65 mm; temperatura de impacto: 0,24 mm/ms (tiempo de impacto: 40 ms); micrómetro láser: láser de clase 1 que funciona en el infrarrojo y que tiene una resolución de 10 µm.
- medir el tiempo de ruptura relativo de la muestra.

Las sesiones de análisis sensorial implicaron a 3 asesores especializados. Se pidió a estos asesores que evaluaran los productos en condiciones de ensayo a ciegas (se codificaron las leches fermentadas). Se evaluaron seis atributos sensoriales diferentes: el "corte", el "espesor con la cuchara", la "viscosidad", el "espesor en boca", la "adherencia en boca" y la "acidez". Cada atributo fue citado con un intervalo entre "0" y "4".

Resultados y comentarios

- Con el fin de lograr un pH 4,60, los fermentos lácticos YOMIX necesitan 375 min y la combinación de cepas (que comprende una cepa DSM 27029) necesita 437 min. Los dos son tiempos tecnológicos usuales para producir leche fermentada a esta temperatura.
- Las características de la leche fermentada fresca obtenidas con la co-inoculación de diferentes cepas y el cultivo YOMIX comercial se notifican en las Tablas 4 y 5:

Tabla 4: Comparación entre leches fermentadas frescas preparadas con la combinación de DSM 27029/DGCC2057/DGCC10697 y preparadas con un cultivo comercial YOMIX™ 465 (YOMIX).

	Viscosidad (Pa.s)	Tiempo relativo de ruptura (ms)
combinación	65,5	99,3
YOMIX	56,8	46,0

Se puede observar que la viscosidad y el tiempo relativo de ruptura de leche fermentada fresca preparada con la combinación son significativamente más altos que los medidos para la leche fermentada fresca preparada con YOMIX.

- 5 **Tabla 5:** Cita de diversos atributos sensoriales para leche fermentada fresca preparada con la combinación y cultivos de fermentos lácticos YOMIX.

	corte	espesor con la cuchara	viscosidad	espesor en boca	adhesividad	acidez,
combinación	1,0	4,0	3,0	4,0	3,0	0,0
YOMIX	3,0	2,5	0,5	2,5	1,0	0,0

10 Para el yogur preparado con la combinación, el "corte" es significativamente inferior para el yogur preparado con YOMIX. Esta característica puede ser de interés para la producción de yogur líquido. El "espesor en cuchara" y "espesor en boca" son significativamente superiores para el yogur preparado con la combinación en comparación con el yogur preparado con YOMIX. El resultado es valioso para la tecnología de yogur líquido. Los resultados sugieren claramente que la cepa DSM 27029, combinada con otras cepas, puede ayudar a los productores de yogur a ofrecer a los consumidores finales productos con una calidad de textura muy alta.

- 15 Por lo tanto, se puede concluir que el uso de DSM 27029 como parte del inóculo proporciona yogur con características de interés para los productores de leches fermentadas frescas.

EJEMPLO 5

- 20 Preparación de leches fermentadas utilizando una cepa DSM 27030 *Preparación de leches fermentadas frescas*

25 Las leches fermentadas han sido preparadas según el ejemplo 4, respecto a la preparación de la base de leche y condiciones de fermentación. La inoculación se llevó a cabo con cepas conservadas a -80 °C en un medio a base de leche. La cepa DSM 27030 se combinó con una segunda cepa de *Streptococcus thermophilus*, DGCC2057, y una cepa perteneciente a *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, DGCC10697. Las tasas de inoculación se ajustaron a 8,10⁵ UFC/ml, 2,10⁵ UFC/ml, y 1,10⁴ UFC/ml de base de leche, respectivamente. Se utilizó un fermento láctico YOMIX™ 465 LYO para referencia. Se inoculó a una dosificación comercial de 20 DCU/100 l. La fermentación se llevó a cabo en el recipiente de yogur de 125 ml lleno con 110 ml +/- 10 ml de la preparación de leche inoculada.

- 30 Con el fin de lograr un pH de 4,60, los fermentos lácticos YOMIX necesitan 375 min y la combinación de cepas necesita 445 min. Los dos son tiempos tecnológicos usuales para producir leches fermentadas a esta temperatura.

Métodos de evaluación de las características de las leches fermentadas frescas.

- 35 La viscosidad de la leche y el análisis sensorial (atributos de textura y sabor) se determinaron y/o calcularon en el ejemplo 4.

Resultados y comentarios

- 40 Las características de le leche fermentada fresca obtenidas con la co-inoculación de diferentes cepas y el cultivo comercial se notifican en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6: Comparación entre leches fermentadas frescas preparadas con una combinación de DSM 27030/DGCC2057/DGCC10697 y preparadas con un cultivo comercial, YOMIX™ 465 (YOMIX).

	Viscosidad (Pa.s)	Tiempo relativo de ruptura (ms)
combinación	62,7	60,0
YOMIX	56,8	46,0

45 Se puede observar que la viscosidad y el tiempo relativo de ruptura de leche fermentada fresca preparada con la combinación son significativamente más altos que los medidos para la leche fermentada fresca preparada con YOMIX.

Tabla 7: Cita de diversos atributos sensoriales para leches fermentadas frescas preparadas con la combinación y cultivos de fermentos lácticos YOMIX.

	corte	espesor con la cuchara	viscosidad	espesor en boca	adhesividad	acidez
combinación	2,0	3,0	1,5	3,5	1,0	0,0
YOMIX	3,0	2,5	0,5	2,5	1,0	0,0

Para el yogur preparado con la combinación, el "corte" es significativamente inferior para el yogur preparado con YOMIX. Esta característica puede ser de interés para la producción de yogur líquido. El "espesor en cuchara" es significativamente superior para el yogur preparado con la combinación en comparación con el yogur preparado con YOMIX. El resultado es valioso para la tecnología de yogur líquido. Los resultados sugieren claramente que la cepa DSM 27030, combinada con otras cepas, puede ayudar a los productores de yogur a ofrecer productos a los consumidores finales con una calidad de textura muy alta.

Por lo tanto, se puede concluir que el uso de DSM 27030 como parte del inóculo proporciona yogur con características de interés para los productores de leches fermentadas frescas.

EJEMPLO 6

Preparación de leches fermentadas utilizando una cepa DSM 27031 *Preparación de leches fermentadas frescas*

Las leches fermentadas han sido preparadas según el ejemplo 4, respecto a la preparación de la base de leche y condiciones de fermentación. La inoculación se llevó a cabo con cepas conservadas a -80 °C en un medio a base de leche. La cepa DSM 27031 se combinó con una segunda cepa de *Streptococcus thermophilus* DGCC2057, y una cepa perteneciente a *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, DGCC10697. Las tasas de inoculación se ajustaron a $7,10^5$ UFC/ml, $3,10^5$ UFC/ml, y $1,10^4$ UFC/ml de base de leche, respectivamente. Se utilizó un fermento láctico YOMIX™ 465 LYO para referencia. Se inoculó a una dosificación comercial de 20 DCU/100 l. La fermentación se llevó a cabo en el recipiente de yogur de 125 ml lleno con 110 ml +/- 10 ml de preparación de leche inoculada.

Con el fin de lograr un pH de 4,60, los fermentos lácticos YOMIX necesitan 375 min y la combinación de cepas necesita 461 min. Los dos son tiempos tecnológicos usuales para producir leches fermentadas a esta temperatura.

Métodos de evaluación de las características de las leches fermentadas frescas.

La viscosidad de la leche y el análisis sensorial (atributos de textura y sabor) se determinaron y/o calcularon en el ejemplo 4.

Características de leches fermentadas frescas

Las características de le leche fermentada fresca obtenidas con la co-inoculación de diferentes cepas y el cultivo comercial se notifican en las Tablas 8 y 9.

Tabla 8: Comparación entre leches fermentadas frescas preparadas con una combinación de DSM 27031/DGCC2057/DGCC10697 y preparadas con un cultivo comercial, YOMIX™ 465 (YOMIX).

	Viscosidad (Pa.s)	Tiempo relativo de ruptura (ms)
combinación	65,2	68,0
YOMIX	56,8	46,0

Se puede observar que la viscosidad y el tiempo relativo de ruptura de leche fermentada fresca preparada con la combinación son significativamente más altos que los medidos para la leche fermentada fresca preparada con YOMIX.

Tabla 9: Cita de diversos atributos sensoriales para leche fermentada fresca preparada con la combinación y cultivos de fermentos lácticos YOMIX.

	corte	espesor con la cuchara	viscosidad	espesor en boca	adhesividad	acidez
combinación	3,0	3,5	1,5	3,5	1,0	0,0
YOMIX	3,0	2,5	0,5	2,5	1,0	0,0

El "espesor en cuchara" y "espesor en boca" son significativamente superiores para el yogur preparado con la combinación en comparación con el yogur preparado con YOMIX. El resultado es valioso para la tecnología de yogur líquido. Los resultados sugieren claramente que la cepa DSM27031, combinada con otras cepas, puede ayudar a los productores de yogur a ofrecer productos a los consumidores finales con una calidad de textura muy alta.

Por lo tanto, se puede concluir que el uso de DSM 27031 como parte del inóculo proporciona yogur con características de interés para los productores de leches fermentadas frescas.

EJEMPLO 7

Preparación de leches fermentadas utilizando una cepa DSM 27031 y comparación con otras cepas de *Streptococcus thermophilus*

Elaboración de leches fermentadas

Las leches fermentadas han sido elaboradas según el ejemplo 4, respecto a la preparación de la base de leche y condiciones de fermentación. Se prepararon dos cultivos mixtos: fórmula A que contiene cepas de *Streptococcus thermophilus* DGCC8897 y DSM 27031, y cepas de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* DGCC10697, y fórmula B que contiene cepas de *Streptococcus thermophilus* DGCC8897 y DGCC7891, y cepas de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* DGCC10697. La inoculación se llevó a cabo con cepas conservadas a -80 °C en un medio a base de leche. Las tasas de inoculación para el cultivo mixto A y el cultivo mixto B, y los valores S₁ y S₂ de cada cepa de *Streptococcus thermophilus* se notificaron en la Tabla 10. En la fórmula B, la cepa DGCC7891 se seleccionó como un ejemplo de referencia, ya que tenía una relación S₂/S₁ elevada (39 %) en comparación con la cepa DSM 27031 (16 %).

Tabla 10: La tasa de inoculación en UFC/ml para cultivos mixtos evaluada se denominó Fórmula A y Fórmula B, y los valores S₁, S₂ y S₂/S₁ para las cepas de *Streptococcus thermophilus* utilizadas.

	<i>Streptococcus thermophilus</i> DGCC8897	<i>Streptococcus thermophilus</i> DGCC7891	<i>Streptococcus thermophilus</i> DSM 27031	<i>Lactobacillus delbrueckii bulgaricus</i> DGCC10697
Fórmula A	8,10 ⁵	-	2,10 ⁵	1,10 ⁴
Fórmula B	8,10 ⁵	2,10 ⁵	-	1,10 ⁴
S ₁ (10 ⁻⁴ U _{pH} /min)	139	34	98	/
S ₂ (10 ⁻⁴ U _{pH} /min)	72	13	16	/
S ₂ /S ₁ (%)	52	39	16	/

La fermentación se llevó a cabo en el recipiente de yogur de 125 ml lleno con 110 ml +/- 10 ml de preparación de leche inoculada.

Con el fin de lograr un pH de 4,60, la fórmula B necesitó 300 min, y la fórmula A necesitó 440 min. Las dos son tiempos tecnológicos usuales para producir leches fermentadas a esta temperatura.

Métodos de evaluación de las características de las leches fermentadas frescas.

La viscosidad de la leche y el análisis sensorial (atributos de textura y sabor) se determinaron y/o calcularon en el ejemplo 4.

Evolución del pH durante el almacenamiento

A pH 4,60 +/- 0,1, el producto fermentado se enfrió a 6 °C, y acto seguido se almacenó a 6 °C durante 50 días. El pH de las leches fermentadas obtenidas con la fórmula A o con la fórmula B almacenadas a 6 °C se ha medido tras transcurrir 14 días, 28 días, y 50 días.

Resultados y comentarios

Las características de la leche fermentada fresca obtenidas con la co-inoculación de diferentes cepas (fórmula A o B) se notifican en las Tablas 11 y 12.

Tabla 11: Comparación entre leches fermentadas frescas elaboradas con la fórmula A o fórmula B.

	Viscosidad (Pa.s)	Tiempo relativo de ruptura (ms)	pH (14 días a 6 °C)	pH (28 días a 6 °C)	pH (50 días a 6 °C)
Fórmula A	42,0	8,0	4,42	4,40	4,39
Fórmula B	35,2	21,0	4,35	4,34	4,33

Se puede observar que la viscosidad de la leche fermentada fresca A es significativamente superior a la leche fermentada fresca B, significando potencialmente un desarrollo de la textura global mayor en el yogur. Además, el tiempo relativo de ruptura del yogur preparado con la fórmula A es notablemente inferior al de la leche fermentada realizada con la fórmula B. Esto puede ser una indicación de menor desarrollo de la viscosidad de este producto.

Cabe destacar asimismo que el valor del pH del yogur elaborado con la fórmula A (es decir, que contiene una cepa según la invención) es significativamente superior al pH del yogur elaborado con la fórmula B (es decir, sin una cepa según la invención), durante la duración total de almacenamiento del yogur a 6 °C (en los días 14, 28 y 50). Curiosamente, el pH del yogur elaborado con la fórmula A es más de 4,40 cuando se almacena 14 días a 6 °C, mientras que el pH del yogur elaborado con la fórmula B es 4,35.

Tabla 12: Cita de diversos atributos sensoriales para leche fermentada fresca obtenida con la fórmula A o fórmula B.

	corte	espesor con la cuchara	viscosidad	espesor en boca	adhesividad	acidez
--	-------	------------------------	------------	-----------------	-------------	--------

ES 2 727 670 T3

Fórmula A	4	2	0	1	0	0
Fórmula B	3	2	0,5	1	0,5	0

La "viscosidad" y la "adhesividad en boca" de la fórmula A preparada con DSM 27031 es menos importante que la fórmula B. Este resultado es valioso para la tecnología de yogur líquido.

- 5 Los resultados sugieren claramente que la cepa DSM 27031, combinada con otras cepas, puede ayudar a los productores de yogur a ofrecer productos a los consumidores finales con una calidad de textura alta y un sabor muy suave.

EJEMPLO 8

10 Preparación de leches fermentadas utilizando una cepa DSM 27029 y comparación con cepas de *Streptococcus thermophilus*

15 Elaboración de leches fermentadas utilizando una cepa DSM 27029

Las leches fermentadas han sido elaboradas según el ejemplo 4, respecto a la preparación de la base de leche y condiciones de fermentación. Se prepararon dos cultivos mixtos: fórmula C que contiene cepas de *Streptococcus thermophilus* DGCC938 y DSM 27029, y cepas de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* DGCC10697, y fórmula D que contiene cepas de *Streptococcus thermophilus* DGCC8897 y DGCC938, y cepas de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* DGCC10697. La inoculación se llevó a cabo con cepas conservadas a -80 °C en un medio a base de leche. Las tasas de inoculación para el cultivo mixto C y el cultivo mixto D, y los valores S1 y S2 de cada cepa de *Streptococcus thermophilus* se notificaron en la Tabla 13.

20 Tabla 13: La tasa de inoculación para cultivos mixtos evaluados se denominaron Fórmula C y Fórmula D, y los valores S₁ S₂ y S₂/S₁ para las cepas de *Streptococcus thermophilus* utilizadas.

	<i>Streptococcus thermophilus</i> DGCC8897	<i>Streptococcus thermophilus</i> DGCC938	<i>Streptococcus thermophilus</i> 27029 DSM	<i>Lactobacillus delbrueckii bulgaricus</i> DGCC10697
Fórmula C	-	1,10 ⁶	3,10 ⁶	8,10 ³
Fórmula D	2,10 ⁶	1,10 ⁶	-	8,10 ⁴
S ₁ (10 ⁻⁴ UpH/min)	139	40	98	/
S ₂ (10 ⁻⁴ UpH/min)	72	15	11	/
S ₂ /S ₁ (%)	52	38	11	/

25 La fermentación se llevó a cabo en el recipiente de yogur de 125 ml lleno con 110 ml +/- 10 ml de preparación de leche inoculada.

Con el fin de lograr un pH de 4,60 (tiempo en el que el producto se enfría de 43 °C a 6 °C), la fermentación de la leche inoculada con la fórmula C tardó 370 min, y 389 min para la fórmula D. Ambas son tiempos tecnológicos usuales para producir leches fermentadas a esta temperatura.

Métodos de evaluación de las características de las leches fermentadas frescas.

35 La viscosidad de la leche y el análisis sensorial (atributos de textura y sabor) se determinaron y/o calcularon en el ejemplo 4.

Evolución del pH durante el almacenamiento

40 El pH de las leches fermentadas obtenidas con la fórmula C o con la fórmula D almacenadas a 6 °C se ha medido tras transcurrir 14 días, 28 días, y 50 días.

Resultados y comentarios

45 Las características de le leche fermentada fresca obtenidas con la co-inoculación de diferentes cepas (fórmula C o D) se notifican en las Tablas 14 y 15.

Tabla 14: Comparación entre leches fermentadas frescas elaboradas con la fórmula C y fórmula D.

	Viscosidad (Pa.s)	Tiempo relativo de ruptura (ms)	pH (14 días a 6 °C)	pH (28 días a 6 °C)	pH (50 días a 6 °C)
Fórmula C	55,9	57,6	4,57	4,50	4,40

ES 2 727 670 T3

Fórmula D	34,8	11,8	4,39	4,37	4,39
-----------	------	------	------	------	------

Se puede observar que la viscosidad de la leche fermentada fresca C es significativamente superior a la leche fermentada fresca D, significando potencialmente un desarrollo de la textura global mayor en el yogur.

5 Cabe destacar asimismo que el valor del pH del yogur elaborado con la fórmula C (es decir, que contiene una cepa según la invención) es significativamente superior al pH del yogur elaborado con la fórmula D (es decir, sin una cepa según la invención), hasta 28 días de almacenamiento. De forma interesante, el pH del yogur elaborado con la fórmula C es de aproximadamente 4,50 cuando se almacena 28 días a 6 °C, mientras que el pH del yogur elaborado con la fórmula D es 4,37.

10 **Tabla 15:** Cita de diversos atributos sensoriales para leche fermentada fresca obtenida con la fórmula C o fórmula D.

	corte	espesor con la cuchara	viscosidad	espesor en boca	acidez
Fórmula C	2,5	4	1,5	4	0
Fórmula D	4	1	0	1	0

15 El "espesor con la cuchara" y la "adhesividad en boca" de la fórmula C preparada con DSM 27029 es más importante que la fórmula D. Este resultado es valioso para la tecnología de yogur líquido. Los resultados sugieren claramente que la cepa DSM 27029, combinada con otras cepas, puede ayudar a los productores de yogur a ofrecer productos a los consumidores finales con una calidad de textura alta y un sabor muy suave.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
- <120> CEPAS DE *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*
- <130> NB40380-
- 25 <160> 103
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 30 <211> 20
- <212> ADN
- 35 <213> *Streptococcus thermophilus*
- <400> 1
- 40 ttccattggg atcttttagt 20
- <210> 2
- <211> 257
- <212> ADN
- 45 <213> *Streptococcus thermophilus*
- <400> 2

ES 2 727 670 T3

acaaatntag gtcatatgga gatacgacaa tatcaatoga ttggttgagg tctcttttta 60
 gatttgtaa ttagttgatt actttttaag tattgccgtt gtaagcagca tatcttaaag 120
 atagagatgc tgtaaaactt tctcatagac tactacatat tgtttttagag ctatgttttt 180
 tctaattggtt ccaaaacaat cgctttctct ttatatgcc accaaaaaaa agccagtggc 240
 tctttttaaa tatcatc 257

5 <210> 3
 <211> 763
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 3

gtttttcccg cacacgcggg ggtgatccta tacctatatac aatggcctcc cacgcataag 60
 cgtttttccc gcacacgcgg gggatgatccc gacaccacta gggcgagtct gagcgcccc 120
 aggtttttcc cgcacacgcg ggggtgatcc cgcaaccctt ccttagacat gggaacagta 180
 ctagtttttc ccgcacacgc gggggtgatc cctgtattat cggcgaatag atcagattct 240
 tctgggtttt cccgcacacg cgggggtgat ccacccttac aaggctgata gacctttgtc 300
 gtttggtttt tcccgcacac gcgggggtga tccctcgttt aaattttag ttatcattaa 360
 caatatgttt tcccgcaca cgcgggggtg atccaaggt aaaattgccg acaatgttgg 420
 aacgttggtt tttcccgcac acgcgggggt gatcctatac attacctcat ttccagctga 480
 gaacattggt ttttcccgcacac cgcgccccgg tgatcctcag cgcctcgaca agcatcaaga 540
 agaacagaag tttttcccgc acacgcgggg gtgatcctgt actggttgag tattcaaggt 600
 aggtgtgcca cgtttttccc gcacacgcgg gggatgatcca tactcaactt ccttacctt 660
 aaccctttc aaagtttttc ccgcacacgc gggggtgatc ctggtcgtgt gtttggcatt 720
 10 ggctcaatgg gaacagtttt tcccgcacac gcgggggtga ttc 763

15 <210> 4
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 4

gtttttcccg cacacgcggg ggtgatccta tacctatatac aatggcctcc cacgcataag 60
 c 61

20 <210> 5
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

25 <400> 5

ES 2 727 670 T3

gtttttcccg cacacgcggg ggtgatcccc acaccactag ggcgagtctg agcgcccca 60
g 61
<210> 6
<211> 61
5 <212> ADN
<213> *Streptococcus thermophilus*
<400> 6

gtttttcccg cacacgcggg ggtgatcccc caaccctcc ttagacatgg gaacagtact 60
10 a 61
<210> 7
<211> 61
15 <212> ADN
<213> *Streptococcus thermophilus*
<400> 7

gtttttcccg cacacgcggg ggtgatccct gtattatcgg cgaatagatc agattcttct 60
20 g 61
<210> 8
<211> 61
25 <212> ADN
<213> *Streptococcus thermophilus*
<400> 8

gtttttcccg cacacgcggg ggtgatccac cottacaagg ctgatagacc tttgtcgttt 60
30 g 61
<210> 9
<211> 61
35 <212> ADN
<213> *Streptococcus thermophilus*
<400> 9

gtttttcccg cacacgcggg ggtgatccct cgtttaaatt tgtagttatc attaacaata 60
40 t 61
<210> 10
<211> 61
45 <212> ADN
<213> *Streptococcus thermophilus*
<400> 10

gtttttcccg cacacgcggg ggtgatccca aggtaaaatt gccgacaatg ttggaacgtt 60
g 61

ES 2 727 670 T3

<210> 11
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*
 5 <400> 11

 gtttttcccg cacacgcggg ggtgatccta tacattacct catttccagc tgagaacatt 60
 g 61
 10 <210> 12
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*
 15 <400> 12

 gtttttcccg cacacgcggg ggtgatcctc agcgcctcga caagcatcaa gaagaacaga 60
 a 61
 20 <210> 13
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*
 25 <400> 13

 gtttttcccg cacacgcggg ggtgatcctg tactggttga gtattcaagg taggtgtgcc 60
 ac 62
 30 <210> 14
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*
 <400> 14

 gtttttcccg cacacgcggg ggtgatccat actcaacttc cttaccctta acccctttca 60
 aa 62
 35 <210> 15
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*
 40 <400> 15

 gtttttcccg cacacgcggg ggtgatcctg gtcgtgtgtt tggcattggc tcaatgggaa 60
 ca 62
 45 <210> 16
 <211> 28
 <212> ADN

<213> *Streptococcus thermophilus*

ES 2 727 670 T3

<400> 16
 gttttcccg cacacgctgg ggtgattc 28

5 <210> 17
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

10 <400> 17
 caaggacagt tattgatttt ataactacta tgtgggtata aaaacgtcaa aatttcattt 60
 gag 63

15 <210> 18
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

20 <400> 18
 ttgattcaac ataaaaagcc agttcaattg aactggctt t41

25 <210> 19
 <211> 2147
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 19
 gtttttgtag tctcaagatt taagtaactg tacaactggt tgacagcaaa tcaagattcg 60
 aattgtgttt ttgtactctc aagatttaag taactgtaca acaatgacga ggagctattg 120
 gcacaactta cagtttttgt actctcaaga ttttaagtaac tgtacaaccg atttgacaat 180
 ctgctgacca ctggtatcgt ttttgtactc tcaagattta agtaactgta caacacactt 240
 ggcaggctta ttactcaaca gcgagttttt gtactctcaa gatttaagta actgtacaac 300
 ctgttccttg ttcttttggt gtatcttttc gtttttgtag tctcaagatt taagtaactg 360
 tacaacttca ttcttccggt tttgtttgcg aatcctggtt ttgtactctc aagatttaag 420

30

ES 2 727 670 T3

taactgtaca acgctggcga ggaacgaac aaggcctcaa cagtttttgt actctcaaga	480
tttaagtaac tgtacaacca tagagtggaa aactagaaac agattcaagt ttttgtactc	540
tcaagattta agtaactgta caacataatg ccggttgaatt acacggcaag gtcagttttt	600
gtactctcaa gatttaagta actgtacaac gagcgagctc gaaataatct taattacaag	660
gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacgttc gctagcgtca tgtggtaacg	720
tatttagttt ttgtactctc aagatttaag taactgtaca acggcgtccc aatcctgatt	780
aatacttact cggtttttgt actctcaaga tttaagtaac tgtacaacaa cacagcaaga	840
caagaggatg atgctatggt ttttgtactc tcaagattta agtaactgta caaccgacac	900
aagaacgat gcaagagttc aaggtttttg tactctcaag atttaagtaa ctgtacaaca	960
caattcttca tccggtaact gctcaagtgg tttttgtact ctcaagattt aagtaactgt	1020
acaacaatta agggcataga aaggagaca acatggtttt tgtactctca agatttaagt	1080
aactgtacaa ccgatattta aatcatttt cataacttca tgtttttgta ctctcaagat	1140
ttaagtaact gtacaacgca gtatcagcaa gcaagctggt agttactggt tttgtactct	1200
caagatttaa gtaactgtac aacataaact atgaaatfff ataattttta agagtttttg	1260
tactctcaag atttaagtaa ctgtacaaca ataatttatg gtatagctta atatcattgg	1320
ttttgtact ctcaagattt aagtaactgt acaactgcat cgagcacggt cgagtttacc	1380
gtttcgtttt tgtactctca agatttaagt aactgtacaa ctctatatcg aggtcaacta	1440
acaattatgc tgtttttgta ctctcaagat ttaagtaact gtacaacaat cgttcaaatt	1500
ctgttttagg tacatttggt tttgtactct caagatttaa gtaactgtac aacaatcaat	1560
acgacaagag ttaaaatggt cttgtttttg tactctcaag atttaagtaa ctgtacaacg	1620
cttagctgtc caatccacga acgtggatgg tttttgtact ctcaagattt aagtaactgt	1680
acaaccaacc aacggtaaca gctacttttt acagtgtttt tgtactctca agatttaagt	1740
aactgtacaa cataactgaa ggataggagc ttgtaaagtc tgtttttgta ctctcaagat	1800
ttaagtaact gtacaactaa tgctacatct caaaggatga tcccagagtt tttgtactct	1860
caagatttaa gtaactgtac aacaagtagt tgatgacctc tacaatgggt tatgtttttg	1920
tactctcaag atttaagtaa ctgtacaaca cctagaagca tttgagcgta tattgattgg	1980
ttttgtact ctcaagattt aagtaactgt acaacaattt tgccccttct ttgccccttg	2040
actaggtttt tgtactctca agatttaagt aactgtacaa caccattagc aatcatttgt	2100
gcccattgag tgtttttgta ctctcaagat ttaagtaact gtacagt	2147

<210> 20
<211> 36

ES 2 727 670 T3

<212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*
 <400> 20
 5 gttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaac 36
 <210> 21
 <211> 36
 10 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*
 <400> 21
 15 gttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacagt 36
 <210> 22
 <211> 66
 <212> ADN
 20 <213> *Streptococcus thermophilus*
 <400> 22
 gttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaactggt tgacagcaaa tcaagattcg 60
 aattgt 66
 25 <210> 23
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*
 30 <400> 23
 gttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacaatg acgaggagct attggcacia 60
 cttaca 66
 35 <210> 24
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*
 40 <400> 24
 gttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaaccgat ttgacaatct gctgaccact 60
 gttatc 66
 <210> 25
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*
 <400> 25
 50 gttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacacac ttggcaggct tattactcaa 60
 cagcga 66
 <210> 26
 <211> 66

ES 2 727 670 T3

	<212> ADN		
	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
	<400> 26		
5		gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacctgt tccttggtct tttgttgat	60
		cttttc	66
	<210> 27		
	<211> 66		
10	<212> ADN		
	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
	<400> 27		
		gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacttca ttcttccggt tttgtttgcg	60
15		aatcct	66
	<210> 28		
	<211> 66		
	<212> ADN		
20	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
	<400> 28		
		gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacgctg gcgaggaaac gaacaaggcc	60
		tcaaca	66
25			
	<210> 29		
	<211> 66		
	<212> ADN		
	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
30	<400> 29		
		gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaaccata gagtggaaaa ctagaacag	60
		attcaa	66
35	<210> 30		
	<211> 66		
	<212> ADN		
	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
40	<400> 30		
		gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacataa tgccgttgaa ttacacggca	60
		aggtca	66
	<210> 31		
45	<211> 66		
	<212> ADN		
	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
	<400> 31		
50			

ES 2 727 670 T3

	gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacgagc gagctcgaaa taatcttaat	60
	tacaag	66
5	<210> 32 <211> 66 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i> <400> 32	
	gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacggtc gctagcgtca tgtggtaacg	60
10	tattta	66
15	<210> 33 <211> 66 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i> <400> 33	
	gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacggcg tcccaatcct gattaatact	60
20	tactcg	66
25	<210> 34 <211> 66 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i> <400> 34	
	gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacaaca cagcaagaca agaggatgat	60
30	gctatg	66
35	<210> 35 <211> 65 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i> <400> 35	
	gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaaccgac acaagaacgt atgcaagagt	60
40	tcaag	65
45	<210> 36 <211> 66 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i> <400> 36	
	gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacacaa ttcttcatcc ggtaactgct	60
	caagtg	66
	<210> 37	

ES 2 727 670 T3

	<211> 66		
	<212> ADN		
	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
5	<400> 37		
		gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacaatt aagggcatag aaagggagac	60
		aacatg	66
	<210> 38		
10	<211> 66		
	<212> ADN		
	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
	<400> 38		
15		gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaaccgat atttaaaatc attttcataa	60
		cttcat	66
	<210> 39		
	<211> 66		
20	<212> ADN		
	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
	<400> 39		
		gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacgcag tatcagcaag caagctgta	60
25		gttact	66
	<210> 40		
	<211> 66		
	<212> ADN		
30	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
	<400> 40		
		gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacataa actatgaaat tttataattt	60
		ttaaga	66
35	<210> 41		
	<211> 66		
	<212> ADN		
	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
40	<400> 41		
		gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacaata atttatggta tagcttaata	60
		tcattg	66
45	<210> 42		
	<211> 66		
	<212> ADN		
	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
50	<400> 42		

ES 2 727 670 T3

	gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaactgca tcgagcacgt tcgagtttac	60
	cgtttc	66
5	<210> 43 <211> 66 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i> <400> 43	
	gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaactcta tatcgaggtc aactaacaat	60
10	tatgct	66
15	<210> 44 <211> 66 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i> <400> 44	
	gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacaatc gttcaaattc tgttttaggt	60
20	acattt	66
25	<210> 45 <211> 66 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i> <400> 45	
	gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacaatc aatcgcgaaa gagttaaatt	60
30	ggtcctt	66
35	<210> 46 <211> 66 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i> <400> 46	
	gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacgctt agctgtccaa tccacgaacg	60
40	tgatg	66
45	<210> 47 <211> 66 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i> <400> 47	
	gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaaccaac caacggtaac agctactttt	60
	tacagt	66

ES 2 727 670 T3

	<210> 48		
	<211> 66		
	<212> ADN		
	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
5	<400> 48		
	gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacataa ctgaaggata ggagcttgta	60	
	aagtct	66	
10	<210> 49		
	<211> 66		
	<212> ADN		
	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
15	<400> 49		
	gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaactaat gctacatctc aaaggatgat	60	
	cccaga	66	
20	<210> 50		
	<211> 66		
	<212> ADN		
	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
25	<400> 50		
	gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacaagt agttgatgac ctctacaatg	60	
	gtttat	66	
30	<210> 51		
	<211> 66		
	<212> ADN		
	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
	<400> 51		
	gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacacct agaagcattt gagcgtatat	60	
35	tgattg	66	
40	<210> 52		
	<211> 66		
	<212> ADN		
	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
	<400> 52		
	gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacaatt ttgcccttc tttgccctt	60	
	gactag	66	
45	<210> 53		
	<211> 66		
	<212> ADN		
	<213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
50			

ES 2 727 670 T3

<400> 53

gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacacca ttagcaatca tttgtgccca 60

ttgagt 66

5 <210> 54
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(63)
 <223> n e s a, c, g o t

15 <400> 54

gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnn 63

20 <210> 55
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(64)
 <223> n e s a, c, g o t

30 <400> 55

gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnnn 64

35 <210> 56
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(65)
 <223> n e s a, c, g o t

<400> 56

gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnnnn 65

45 <210> 57
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(66)

ES 2 727 670 T3

<223> n e s a , c , g o t

<400> 57

gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

5 nnnnnnn 66

<210> 58

<211> 67

<212> ADN

10 <213> *Streptococcus thermophilus*

<220>

<221> misc_feature

<222> (37)..(67)

15 <223> n e s a , c , g o t

<400> 58

gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnnnnnnn 67

20

<210> 59

<211> 68

<212> ADN

25 <213> *Streptococcus thermophilus*

<220>

<221> misc_feature

<222> (37)..(68)

30 <223> n e s a , c , g o t

<400> 59

gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnnnnnnn 68

35 <210> 60

<211> 69

<212> ADN

40 <213> *Streptococcus thermophilus*

<220>

<221> misc_feature

<222> (37)..(69)

45 <223> n e s a , c , g o t

<400> 60

gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnnnnnnn 69

50 <210> 61

<211> 66

<212> ADN

<213> *Streptococcus thermophilus*

ES 2 727 670 T3

	<400> 61		
		gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaaccaac acattcaaca gattaatgaa	60
		gaatac	66
5	<210> 62 <211> 66 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
10	<400> 62		
		gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaactcca ctcacgtaca aatagtgagt	60
		gtactc	66
15	<210> 63 <211> 66 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
20	<400> 63		
		gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacaaat cagttttttg ttcagaaact	60
		tgttct	66
25	<210> 64 <211> 66 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
	<400> 64		
		gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaaccagc ttgaaatggt tattgaagca	60
30		gcagtg	66
35	<210> 65 <211> 66 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
	<400> 65		
		gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacgccc ttctaattgg attaccttcc	60
40		gaggtg	66
45	<210> 66 <211> 66 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
	<400> 66		

ES 2 727 670 T3

	gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacttat atcgaagaac gactgaaaga	60
	gcttga	66
5	<210> 67 <211> 65 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i> <400> 67	
	gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacctgg aaagcatatt gagggagcta	60
10	ctctt	65
15	<210> 68 <211> 66 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i> <400> 68	
	gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaactcta atcccactag gaatagtggg	60
20	tagtaa	66
25	<210> 69 <211> 66 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i> <400> 69	
	gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacctca gtcgttactg gtgaaccagt	60
30	ttcaat	66
35	<210> 70 <211> 66 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i> <400> 70	
	gtttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaacaagc agaaaagaaa tattttggta	60
40	agtatg	66
45	<210> 71 <211> 321 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i> <400> 71	

ES 2 727 670 T3

taaattagta ataagtatag atagtcttga gttatttcaa gactatcttt tagtatttag 60
 tagtttctgt atgaagttga atgggataat cattttgtta gagagtagat tataaggatt 120
 tgatagagga ggaattaagt tgcttgacat atgattatta agaaataatc taatatggtg 180
 acagtcacat cttgtctaaa acgttgatat ataaggattt ttaaggtata ataaatataa 240
 aattggaatt attttgaagc tgaagtcatg ctgagattaa tagtgcgatt acgaaatctg 300
 gtagaaaaga taccctacga g 321

<210> 72

<211> 83

5 <212> ADN

<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 72

ttttgttacc acaattttcg gttgacatct cttagaactc atcttatcat aaaggagtct 60

10 agtattaataa tatgagaagg aac 83

<210> 73

<211> 828

<212> ADN

15 <213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 73

gttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc caaaacaaat tctaaacgct aaagaggaag 60

aggacagttt tagagctgtg ttgtttcgaa tggttccaaa actactgctg tattagcttg 120

gttgttggtt tggttttaga gctgtgttgt ttcgaatggt tccaaaactt cctcttgtaa 180

acattttatt aataatgtgt ttttagagctg tgttgtttcg aatggttcca aaactatccc 240

agagaatgga agaacaatta tagagtttta gagctgtggt gtttcgaatg gttccaaaac 300

tatgaattgt caaattaacg gttgcgctaa gttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc 360

caaaaccgat ggaaatgatg gcttgccagg taaggagttt tagagctgtg ttgtttcgaa 420

tggttccaaa acaatgggaa agtagctata tatgatccag aggttttaga gctgtgttgt 480

ttcgaatggt tccaaaacga aggcacaaga aagtcaaatg cgtagcgcgt ttttagagctg 540

tgttgtttcg aatggttcca aaacaatttt aacagatata gtgtaatcgg tattgtttta 600

gagctgtggt gtttcgaatg gttccaaaac ctattactat acttccgaag agattgcaga 660

gttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc caaaactatc ccagagaatg gaagaacaat 720

tatagagttt tagagctgtg ttgtttcgaa tggttccaaa actatgaatt gtcaaattaa 780

cggttgcgct aagtttttaga gctgtgttgt ttcgaatggt tccaaaac 828

20 <210> 74

<211> 36

<212> ADN

<213> *Streptococcus thermophilus*

25

ES 2 727 670 T3

<400> 74
 gttttagagc tgtggtggtt cgaatgggtc caaaac 36

5 <210> 75
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

10 <400> 75
 gttttagagc tgtggtggtt cgaatgggtc caaaaacaat tctaaacgct aaagaggaag 60
 aggaca 66

15 <210> 76
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

20 <400> 76
 gttttagagc tgtggtggtt cgaatgggtc caaaactact gctgtattag cttggttgtt 60
 ggtttg 66

25 <210> 77
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 77
 gttttagagc tgtggtggtt cgaatgggtc caaaacttcc tcttgtaaac attttattaa 60
 taatgt 66

30 <210> 78
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

35 <400> 78
 gttttagagc tgtggtggtt cgaatgggtc caaaactatc ccagagaatg gaagaacaat 60
 tataga 66

40 <210> 79
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

45 <400> 79
 gttttagagc tgtggtggtt cgaatgggtc caaaactatg aattgtcaaa ttaacggttg 60
 cgctaa 66

50 <210> 80

ES 2 727 670 T3

<211> 66
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

5 <400> 80

gttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc caaaaccgat ggaaatgatg gcttgccagg 60
 taagga 66

<210> 81
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

10

15 <400> 81

gttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc caaaacaatg ggaaagtagc tatatatgat 60
 ccagag 66

<210> 82
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

20

<400> 82

gttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc caaaacgaag gcacaagaaa gtcaaatgcg 60
 tagcgc 66

25

<210> 83
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

30

<400> 83

gttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc caaaacaatt ttaacagata tagtgtaatc 60
 ggtatt 66

35

<210> 84
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

40

<400> 84

gttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc caaaacctat tactatactt ccgaagagat 60
 tgcaga 66

45

<210> 85
 <211> 66
 <212> ADN

ES 2 727 670 T3

<213> *Streptococcus thermophilus*
 <400> 85

gttttagagc tgtgttggtt cgaatggttc caaaactatc ccagagaatg gaagaacaat 60
 5 tataga 66

<210> 86
 <211> 66
 <212> ADN
 10 <213> *Streptococcus thermophilus*
 <400> 86

gttttagagc tgtgttggtt cgaatggttc caaaactatg aattgtcaaa ttaacggttg 60
 cgctaa 66

15 <210> 87
 <211> 63
 <212> ADN
 20 <213> *Streptococcus thermophilus*
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(63)
 <223> n e s a , c , g o t
 25 <400> 87

gttttagagc tgtgttggtt cgaatggttc caaaacnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60
 nnn 63

30 <210> 88
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(64)
 <223> n e s a , c , g o t
 40 <400> 88

gttttagagc tgtgttggtt cgaatggttc caaaacnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60
 nnnn 64

45 <210> 89
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(65)
 <223> n e s a , c , g o t

ES 2 727 670 T3

	<400> 89		
	gtttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc caaaacnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	60	
	nnnnn	65	
5	<210> 90 <211> 66 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
10	<220> <221> misc_feature <222> (37)..(66) <223> n es a, c, g o t		
15	<400> 90		
	gtttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc caaaacnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	60	
	nnnnnnn	66	
20	<210> 91 <211> 67 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
25	<220> <221> misc_feature <222> (37)..(67) <223> n es a, c, g o t		
30	<400> 91		
	gtttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc caaaacnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	60	
	nnnnnnn	66	
35	<210> 92 <211> 68 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
40	<220> <221> misc_feature <222> (37)..(68) <223> n es a, c, g o t		
45	<400> 92		
	gtttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc caaaacnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	60	
	nnnnnnnnn	68	
50	<210> 93 <211> 69 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		

ES 2 727 670 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(69)
 <223> n e s a , c , g o t
 5 <400> 93

 gtttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc caaaacnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 6
 nnnnnnnnn 6
 10 <210> 94
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*
 15 <400> 94

 gtttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc caaacagac ccacaaatgg cacttaaaga 60
 tgcaat 66
 20 <210> 95
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*
 25 <400> 95

 gtttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc caaaactatt gtagacactg ggaacggtgg 60
 ttatta 66
 30 <210> 96
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*
 <400> 96

 gtttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc caaaactaga ggtaatgacg gcttaccggg 60
 taaaga 66
 35 <210> 97
 <211> 66
 <212> ADN
 40 <213> *Streptococcus thermophilus*
 <400> 97

 gtttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc caaaacttag ccttaagcgg cattaagaag 60
 cttggt 66
 45 <210> 98
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus*

ES 2 727 670 T3

	<400> 98		
	gttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc caaaaccaa taatattaat aaccctaacc	60	
	gtacca	66	
5	<210> 99 <211> 66 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
10	<400> 99		
	gttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc caaaacttgt ggcacaaaca aatgaatta	60	
	aagatt	66	
15	<210> 100 <211> 66 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
20	<400> 100		
	gttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc caaaactgta gacgacacaa tgaaacgtgt	60	
	gattta	66	
25	<210> 101 <211> 66 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
	<400> 101		
	gttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc caaaactcca gttctaacga cactaaaact	60	
30	aagcga	66	
35	<210> 102 <211> 67 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
	<400> 102		
	gttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc caaaacaaat tacctctagc gttctttat	60	
40	aatagct	67	
45	<210> 103 <211> 66 <212> ADN <213> <i>Streptococcus thermophilus</i>		
	<400> 103		
	gttttagagc tgtgttgttt cgaatggttc caaaaccaat ccagaggtta atcaagcagt	60	
	attcaa	66	

REIVINDICACIONES

1. *Streptococcus thermophilus* seleccionada entre el grupo que consiste en:

- 5 (1) la cepa DSM 27029, depositada en virtud del Tratado de Budapest el 21 de marzo de 2013 en el nombre de Danisco Deutschland GmbH ante Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH;
 (2) la cepa DSM 27030, depositada en virtud del Tratado de Budapest el 21 de marzo de 2013 en el nombre de Danisco Deutschland GmbH ante Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH;
 10 (3) la cepa DSM 27031, depositada en virtud del Tratado de Budapest el 21 de marzo de 2013 en el nombre de Danisco Deutschland GmbH ante Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH; y
 (4) una cepa mutante de la cepa DSM 27029, de la cepa DSM 27030, o la cepa DSM 27031, en la que la cinética de acidificación de la leche de dicho mutante se caracteriza por:

- 15 - una velocidad promedio de acidificación entre pH 6,00 y pH 5,30 que es al menos $70,10^{-4}$ UpH/min o igual a $70,10^{-4}$ UpH/min, calculada como se describe en el Ensayo I, en particular que está comprendida entre $70,10^{-4}$ y $250,10^{-4}$, entre $70,10^{-4}$ y $200,10^{-4}$, entre $70,10^{-4}$ y $180,10^{-4}$, o entre $70,10^{-4}$ y $140,10^{-4}$ UpH/min, y
 - una velocidad promedio de acidificación entre pH 5,30 y pH 5,00 que es inferior a $22,10^{-4}$ UpH/min o igual a $22,10^{-4}$ UpH/min, calculada como se describe en el Ensayo I, en particular que está comprendida entre $1,10^{-4}$ y $20,10^{-4}$, entre $2,10^{-4}$ y $22,10^{-4}$, o entre $2,10^{-4}$ y $20,10^{-4}$ UpH/min

20 en la que el ensayo I consiste en: Leche de vaca UHT semidesnatada comercial (1,5 % de materias grasas en p/p) ["Le Petit Vendéen"; GLAC - Francia] que es suplementada con 3 % (P/P) de leche desnatada en polvo. Después de la disolución, la mezcla es tratada térmicamente a 90 °C durante 10 min. La etapa de calentamiento de 20-25 °C a 90 °C no se prolongará más de 35 min y la etapa de enfriamiento de 90 °C a 35 °C-45 °C no se prolongará más de 45
 25 min. Justo antes de la inoculación, se añade 1 g/100 l (p/v) de formiato de sodio. La inoculación se lleva a cabo con cepas conservadas a -80 °C en un medio a base de leche. La tasa de inoculación es $1,10^6$ UFC/ml de base de leche. La temperatura de incubación se establece en 43 °C +/- 1 °C, y se mantiene constante en un baño de agua durante la fermentación. Se utilizó un sistema Cinac para la medición en línea del cambio del pH. El pH es registrado cada 5 min durante 24 h, y resumido en una tabla o presentado como una curva CINAC. Se determinaron los 3 siguientes
 30 parámetros: tiempo para pH = 6,00 ($T_{pH6,00}$), tiempo para pH = 5,30 ($T_{pH3,30}$) y tiempo para pH = 5,00 ($T_{pH5,00}$). Estos parámetros son obtenidos directamente por el registro en línea, o cuando el tiempo para obtener el pH objetivo no está presente en la tabla, se realiza una interpolación lineal entre los dos datos registrados.

35 2. Una composición que comprende o consiste en un cultivo de la cepa de *Streptococcus thermophilus* según la reivindicación 1, y opcionalmente comprende además al menos otro microorganismo, tal como al menos una bacteria del ácido láctico y/o al menos una bacteria propiónica.

40 3. La composición según la reivindicación 2, en la que dicha al menos una bacteria del ácido láctico es una cepa diferente de la especie *Streptococcus thermophilus*, y/o una cepa de la subespecie *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, y/o una cepa del género *Bifidobacterium*, y/o cualquier combinación de las mismas.

4. La composición según la reivindicación 2 o 3, que comprende además, en particular componente(s) desde el punto de vista alimenticio aceptable(s), tales como agentes crioprotectores, agentes de refuerzo y/o aditivos comunes.

45 5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, que está en una forma líquida, congelada, o secada en polvo.

50 6. Uso de un cultivo de la cepa según la reivindicación 1 o de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, para preparar un producto, en particular un producto alimenticio para seres humanos o para animales, en particular un producto fermentado, en particular un producto alimenticio fermentado para seres humanos o un producto alimenticio fermentado para animales.

55 7. Un método para preparar un producto, en particular un producto alimenticio para seres humanos o para animales, en particular un producto fermentado, en particular un producto alimenticio fermentado para seres humanos o un producto alimenticio fermentado para animales, en el que dicho método comprende la adición de un cultivo de la cepa según la reivindicación 1 o de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 en un sustrato, en particular un sustrato de leche, opcionalmente fermentación de dicho sustrato, y obtención de dicho producto.

60 8. Un producto, en particular un producto alimenticio para seres humanos o para animales, en particular un producto fermentado, en particular un producto alimenticio fermentado para seres humanos o un producto alimenticio fermentado para animales, obtenible por el método de la reivindicación 7.

9. Un producto, en particular un producto alimenticio para seres humanos o para animales, en particular un producto fermentado, en particular un producto alimenticio fermentado para seres humanos o un producto alimenticio fermentado para animales, que comprende un cultivo de la cepa según la reivindicación 1 o la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.

5 10. El producto según la reivindicación 8 o 9, que es un producto lácteo, tal como yogur, queso, suero de leche, cuajada, crema agria, kéfir, una bebida fermentada a base de suero de leche, leche fermentada de yegua, una bebida a base de leche, una bebida de yogur, leche fermentada, nata madurada, queso fresco, leche, un retentado de producto lácteo, un queso elaborado, requesón, un postre de crema, o leche para lactantes.

10

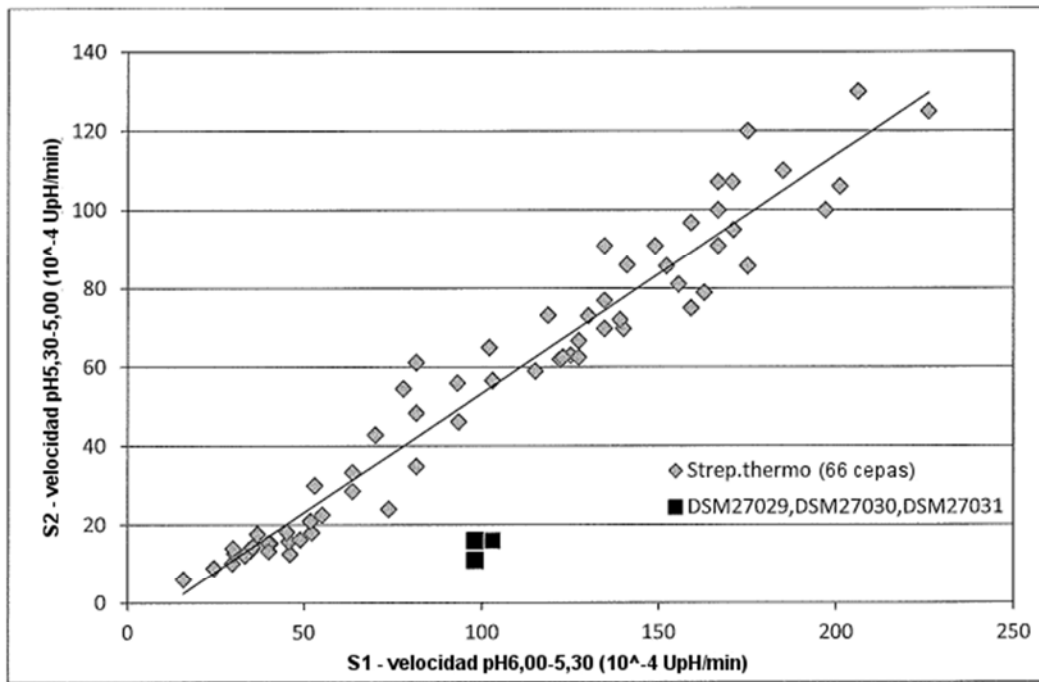
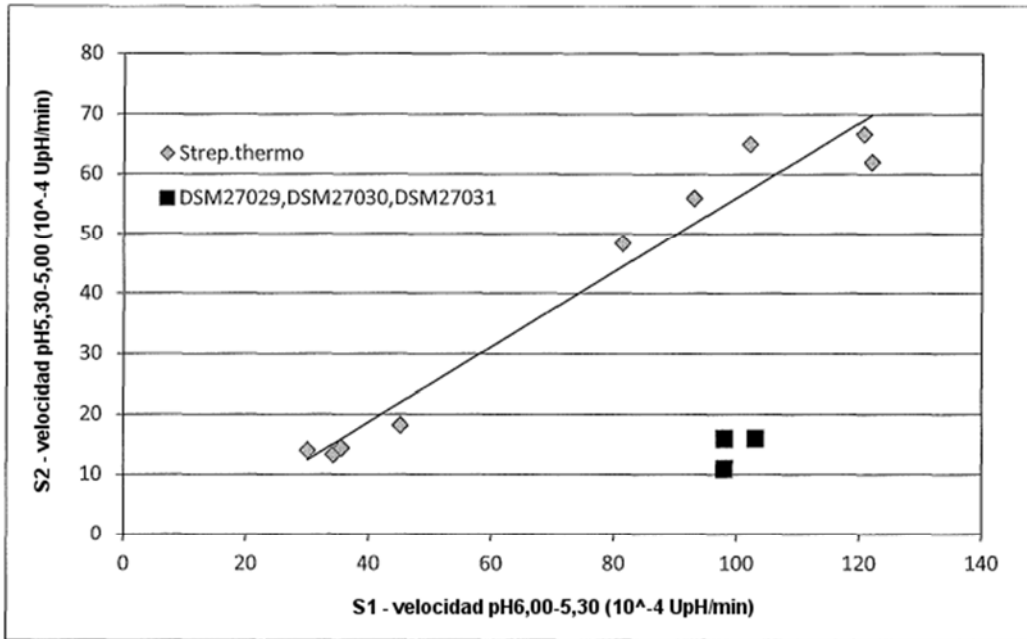


Fig. 1

A.



B.

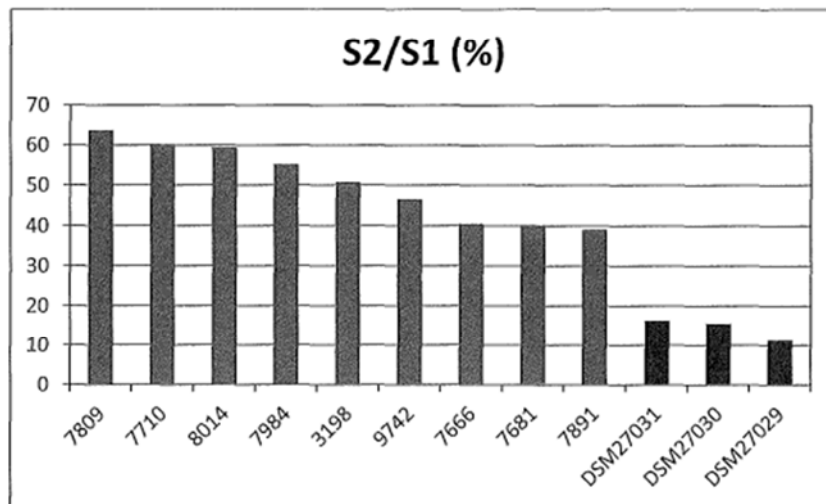


Fig. 2