

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091541 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.09.24

(22) Дата подачи заявки
2018.12.21

(51) Int. Cl. C12R 1/46 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
C12N 15/01 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)
C12N 9/38 (2006.01)

(54) НОВЫЕ МОЛОЧНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ С ПОДСЛАЩИВАЮЩИМИ СВОЙСТВАМИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 17210053.9

(32) 2017.12.22

(33) EP

(86) PCT/EP2018/086668

(87) WO 2019/122365 2019.06.27

(71) Заявитель:

ДЮПОН НЬЮТРИШН
БАЙОСАЙЕНСИЗ АПС (DK)

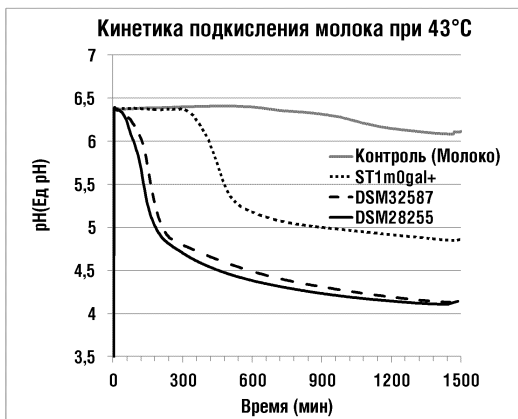
(72) Изобретатель:

Кошю-Блашер Армелль, Фремо
Кристоф, Дефужер Тома (FR)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, высвобождающему глюкозу во время ферментации молока. Этот штамм *Streptococcus thermophilus* несет мутацию в гене *glcK*, в гене *scrA*, в гене *lacZ* и/или в гене *ptsH* и, необязательно, в одном или более генах, в частности в одном гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-специфической PTS. Изобретение также касается композиции, содержащей по меньшей мере один лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению и касается применения этого штамма или композиции для производства ферментированного молочного продукта.



A1

202091541

202091541

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562974EA/019

НОВЫЕ МОЛОЧНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ С ПОДСЛАЩИВАЮЩИМИ СВОЙСТВАМИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, высвобождающему глюкозу во время ферментации молока. Этот штамм *Streptococcus thermophilus* несет мутацию в гене *glcK*, кодирующем глюкокиназу, чья активность глюкокиназы в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю, и где, необязательно, максимальная скорость прямой реакции (V_{max}) глюкокиназы в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю, а также в гене *csrA*, в гене *lacZ* и/или в гене *ptsH*. Этот штамм может дополнительно нести мутацию в одном или более генах, в частности, в одном гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-специфической PTS. Изобретение также касается композиции, содержащей по меньшей мере один лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению, и касается применения этого штамма или композиции для производства ферментированного молочного продукта.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Пищевая промышленность использует бактерии для улучшения вкуса и текстуры пищевых или кормовых продуктов. В случае молочной промышленности молочнокислые бактерии обычно используются для того, чтобы, например, вызвать подкисление молока (путем ферментации лактозы) и текстурировать продукт, в который они включены. Например, молочнокислые бактерии вида *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) широко используются отдельно или в комбинации с другими бактериями при производстве свежих ферментированных молочных продуктов, таких как йогурт. Термин «йогурт» определяется в соответствии с французскими и европейскими правилами, то есть коагулированные молочные продукты, полученные путем ферментации молочной кислоты с использованием *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lb. *bulgaricus*).

Из-за вкуса потребителей свежие ферментированные молочные продукты часто подслащиваются путем добавления фруктов, сахара или подсластителей. Таким образом, искусственные или натуральные подсластители обычно добавляют для улучшения сладких свойств конечных свежих ферментированных молочных продуктов. Однако в то же время растет спрос на более здоровые продукты, где не добавляются никакие добавки к конечному продукту.

Следовательно, существует потребность в процессе производства сладких свежих ферментированных молочных продуктов с использованием меньшего количества или в отсутствие добавок. Решения на основе штаммов, естественно продуцирующих глюкозу, недавно обсуждались или предлагались.

Pool et al. (2006. *Metabolic Engineering* 8 (5); 456-464) обсуждают естественное

подслащивание пищевых продуктов путем конструирования *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) для производства глюкозы. Таким образом, Pool et al. раскрывают штамм *Lactococcus lactis*, в котором метаболизм глюкозы полностью нарушается в результате делеции гена *glcK*, кодирующего глюкокиназу (то есть отсутствие активности глюкокиназы), генов *ptnABCD*, кодирующих манноза/глюкоза-PTS, и генов *ptcB-ptcA*, кодирующих белковый комплекс ЕПВА^{cel} глюкоза-PTS ЕП^{cel}. Таким образом, полученный штамм может только ферментировать галактозный фрагмент лактозы (в результате того, что штаммы *L. lactis* являются галактоза-ферментирующими штаммами), тогда как глюкозный фрагмент накапливается внеклеточно. Однако виды *Lactococcus lactis* не обязательно пригодны для производства всех свежих ферментированных молочных продуктов и, в частности, йогуртов (для которых требуются штаммы *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*).

WO2013/160413, WO2017/103051 и Sørensen et al. (2016; *Appl Environ Microbiol* 82 (12): 3683-3692) раскрывают штаммы *Streptococcus thermophilus* с улучшенными свойствами для естественного подслащивания пищевых продуктов. Эти штаммы *Streptococcus thermophilus* ферментируют галактозу и несут мутацию в их гене *glcK*, нокаутирующую способность фосфорилировать глюкозу (то есть эти штаммы *S. thermophilus*, ферментирующие галактозу, демонстрируют отсутствие детектируемой активности *GlcK*). Фенотип, ферментирующий галактозу, получают путем мутации в области промотора оперона галактозы (в 5'-области от гена *galK*), который, как известно, кодирует ферменты *GalK*, *GalT*, *GalE* и *GalM*. Изменения аминокислот приводят к образованию белка *GlcK* с отсутствием детектируемой активности глюкокиназы, S72P, T141I и G249R. Однако эти штаммы значительно замедлены по кинетике подкисления.

Van den Bogaard et al. (*Journal of Bacteriology*; 2000. 182: 5982-5989) раскрывают нокаут (полное нарушение) гена *sspA* в *Streptococcus thermophilus*. Однако такой мутант, хотя он высвобождает глюкозу (13 мМ) во время роста на M17, дополненной лактозой (20 мМ), значительно замедляет кинетику подкисления (длительное время задержки и пониженная скорость роста), что делает его непригодным для использования в промышленном масштабе.

В WO 2015/0149940 (Tine SA) раскрыт способ идентификации глюкозо-секретирующих молочнокислых бактерий путем проведения случайного мутагенеза в крупном масштабе и определения глюкозы ферментативными средствами на лактозо-положительных мутантах. Однако Tine ничего не сообщает о природе и количестве мутаций и/или генов, на которые воздействует метод. В части примера полученные мутанты являются галактозо-положительными штаммами, как описано в примере 1 (отбор штаммов *S. thermophilus* на чашке с агаром M17, дополненном галактозой).

Поэтому существует острая потребность в штаммах, способных естественным образом продуцировать глюкозу и которые можно использовать в промышленном масштабе для производства свежих ферментированных молочных продуктов, включая йогурты.

Описание чертежей

Фигура 1: Выравнивание последовательности белка GlcK штаммов DGCC7710 (DSM28255), DSM32587 и ST1m-glcK0-gal+. Различия с белком GlcK DGCC7710 (SEQ ID NO: 2) заключены в квадрат.

Фигура 2: Кривая подкисления молока (pH во времени), полученная для штаммов DGCC7710, DSM32587 и ST1m-glcK0-gal+.

Фигура 3: Кривая подкисления молока (pH во времени), полученная для (А) штамма ST1.1 и его мутанта E275K (ST1.1m-glcK), и (В) штамма ST1.2 и его мутанта E275K (ST1.2m-glcK).

Фигура 4: отношение активности бета-галактозидазы согласно анализу с помощью теста D к активности глюкокиназы согласно анализу с помощью теста E для различных штаммов *Streptococcus thermophilus* по изобретению и их родительских штаммов (контроль).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение доказало, что, помимо мутаций, полностью отменяющих функцию белков, участвующих в метаболизме сахара (таких как нарушение *ссрА*, белок GlcK при отсутствии детектируемой активности глюкокиназы), мутации, сильно нарушающие метаболизм сахара (и не ингибирующие его), используются для конструирования штаммов *Streptococcus thermophilus*, высвобождающих глюкозу в значительной концентрации во время молочной ферментации. Авторы изобретения ясно показали, что такие штаммы *Streptococcus thermophilus* могут характеризоваться отношением их активности бета-галактозидазы к их активности глюкокиназы. Этим отношением объясняется поведение лактозо-положительных, галактозо-отрицательных штаммов *Streptococcus thermophilus* по изобретению в отношении использования как лактозы, так и глюкозы во время их роста, особенно при использовании во время ферментации молока. Действительно, бета-галактозидаза ответственна за гидролиз лактозы в галактозу и глюкозу, тогда как глюкокиназа делает глюкозу доступной для ее использования через путь гликолиза. Таким образом, авторы изобретения показали, что увеличение активности бета-галактозидазы без какого-либо изменения уровня активности глюкокиназы [в указанном в настоящем документе соотношении] приводит к увеличению свободной глюкозы вследствие чрезмерного гидролиза лактозы. С другой стороны, снижение активности глюкокиназы без какого-либо изменения активности бета-галактозидазы [в указанном в настоящем документе соотношении] оказывает такое же метаболическое воздействие. Интересно, что штаммы по изобретению не должны быть галактозо-положительными (фенотип, который, как было показано, нестабилен в лактозе).

Таким образом, настоящее изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, где отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме согласно анализу с помощью теста D к активности глюкокиназы согласно анализу с помощью теста E составляет по меньшей мере 4×10^{-6} , по меньшей мере 5×10^{-6} , по меньшей мере 6×10^{-6} , по меньшей мере 7×10^{-6} или

по меньшей мере 8×10^{-6} .

Отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме согласно анализу с помощью теста D к активности глюкокиназы в указанном штамме согласно анализу с помощью теста E

Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению демонстрирует (или имеет) отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляющее по меньшей мере 4×10^{-6} . В одном варианте осуществления отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, выбрано из группы, состоящей из по меньшей мере 4×10^{-6} , по меньшей мере 5×10^{-6} по меньшей мере 6×10^{-6} , по меньшей мере 7×10^{-6} или по меньшей мере 8×10^{-6} . В одном варианте осуществления отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, составляет по меньшей мере 5×10^{-6} . В одном варианте осуществления отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, составляет по меньшей мере 6×10^{-6} . В одном варианте осуществления отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к глюкокиназе, согласно анализу с помощью теста E, составляет по меньшей мере 7×10^{-6} . В одном варианте осуществления отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к глюкокиназе, согласно анализу с помощью теста E, составляет по меньшей мере 8×10^{-6} .

Каким бы ни было минимальное значение отношения, как определено в настоящем документе, отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, составляет не более чем 8×10^{-3} .

Следует отметить, что отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, как определено в настоящем документе, не поддается измерению для штамма *Streptococcus thermophilus*, активность глюкокиназы которого равна нулю или не детектируется с помощью Теста, описанного в настоящем документе (как например, штаммы, раскрытые в Таблице 1). Также следует отметить, что отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, как определено в настоящем документе, составляет более чем 8×10^{-3} для штаммов *Streptococcus thermophilus*, активность глюкокиназы которых резко снижена. Во избежание сомнений, эти штаммы *Streptococcus thermophilus* не являются частью изобретения.

Согласно изобретению активность бета-галактозидазы в штамме *Streptococcus thermophilus* по изобретению оценивают с помощью теста D [т.е. тест D проводят с

использованием штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению]:

Тест D:

Получают свежую ночную культуру штамма *Streptococcus thermophilus* для анализа в М17, содержащей 30 г/л лактозы, и используют для инокуляции в 1% (об./об.) 10 мл свежей М17 с 30 г/л лактозы. Клетки собирают центрифугированием (6000 г, 10 мин, 4 °С) после 3 часов роста на М17+30 г/л лактозы при 42 °С, промывают в 1,5 мл буфера для холодного лизиса (KPO₄ 0,1 М) и ресуспендируют в 300 мкл буфера для холодного лизиса. Не содержащие ЭДТА ингибиторы протеазы «сOmplete™» (Roche, ссылка поставщика 04693132001) добавляют в буфер для лизиса, как описано поставщиком. Клетки разрушают добавлением 100 мг стеклянных гранул (150-212 мкм, Sigma G1145) к 250 мкл ресуспендированных клеток и колебаниями с частотой 30 циклов/с в течение 6 минут в вибромельнице MM200 (Retsch, Наан, Германия). Клеточный дебрис и стеклянные гранулы удаляют центрифугированием (14000 г, 15 мин, 4 °С) и супернатант переносят в чистую пробирку для центрифугирования объемом 1,5 мл, которую держат на льду. Содержание общего белка определяют с использованием набора для определения белка FLUKA-Rapid (ref 51254). Активность бета-галактозидазы в клеточных экстрактах определяют спектрофотометрически путем мониторинга гидролиза О-нитро-фенол-бета-галактозида (ONPG) в галактозе и О-нитрофеноле (ONP). 20 мкл бактериального экстракта смешивают с 135 мкл реакционного буфера (NaPO₄ 0,1 М+KCl 0,01 М+MgSO₄ 0,001 М+ONPG 3 мМ+бета-меркапто-этанол 60 мМ, pH=6). Производство ONP приводит к желтому цвету в пробирке. Когда появляется этот цвет, реакция блокируется добавлением 250 мкл стоп-буфера (Na₂CO₃ 1 М). Оптическую плотность при 420 нм измеряют с использованием считывающего устройства для микропланшетов Synergy HT (БИО-ТЕК). Одна единица галактозидазы соответствует количеству фермента, который катализирует выработку 1 мкмоль ONP в минуту в условиях анализа. Активность бета-галактозидазы рассчитывается следующим образом:

активность бета-галактозидазы (Ед/г общего белкового экстракта) = $dOD \times V / [dt \times l \times \epsilon \times Q_{prot}]$, где:

- dOD - изменение оптической плотности (OD) при 420 нм между пустой средой и тестируемым образцом

- V - объем реакции, в которой измеряется оптическая плотность (в настоящем документе 250 мкл)

- dt=представляет продолжительность в минутах между добавлением 20 мкл бактериального экстракта и добавлением 250 мкл стоп-буфера

- l=длина оптического пути (в данном случае 0,73 см)

- ϵ =молярный коэффициент ослабления ONP (в настоящем документе 4500 см²/мкмоль)

- Q_{prot}=количество белка в кювете (в г)

Измерения, по меньшей мере, трижды для каждого образца, и значения удельной активности бета-галактозидазы, приведенные в настоящем документе в тесте D,

представляют собой среднее значение трех независимых экспериментов.

Согласно изобретению для определения соотношения, как определено в настоящем документе, активность глюкокиназы в штамме *Streptococcus thermophilus* по изобретению анализируют с помощью теста Е [т.е. тест Е проводится с использованием штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению].

Тест Е:

Получают свежую ночную культуру штамма *Streptococcus thermophilus* для анализа в М17, содержащей 30 г/л лактозы, и используют для инокуляции в 1% (об./об.) 10 мл свежей М17 с 30 г/л лактозы. Клетки собирают центрифугированием (6000 г, 10 мин, 4 °С) после 3-часового роста на М17+30 г/л лактозы при 42 °С, промывают в 1,5 мл холодного буфера GLCK (5 mM MgCl₂, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ [pH 7,2]) и ресуспендируют в 300 мкл холодного буфера GLCK. Ингибиторы протеаз без EDTA «Complete™» (Roche, ссылка поставщика 04693132001) добавляют в буфер GLCK, как описано поставщиком. Клетки разрушают добавлением 100 мг стеклянных гранул (150-212 мкм, Sigma G1145) к 250 мкл ресуспендированных клеток и колебаниям с частотой 30 циклов/с в течение 6 минут в вибромельнице MM200 (Retsch, Хан, Германия). Клеточный дебрис и стеклянные гранулы удаляют центрифугированием (14000 г, 15 мин, 4 °С) и супернатант переносят в чистую пробирку для центрифугирования объемом 1,5 мл, которую держат на льду. Содержание общего белка определяют с использованием набора для определения белка FLUKA-Rapid (ref 51254). Активность глюкокиназы в клеточных экстрактах определяют спектрофотометрически с помощью глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G-6PDH, EC1.1.1.49): анализ, связанный с NADPH (Porter et al., 1982), по существу, как описано Pool et al., (2006). Каждый образец (5, 10 и 20 мкл) добавляют в буфер для анализа (10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ [pH 7,2], 5 mM MgCl₂, 1 mM АТР, 20 mM глюкозы, 1 mM NADP, 1 Ед G-6PDH) в 250 мкл конечного объема, и смесь оставляют на 5 мин при 30 °С. Оптическую плотность при 340 нм измеряют в течение 5 минут с помощью считывающего устройства для микропланшетов Synergy HT (БИО-ТЕК). Одна единица глюкокиназы соответствует количеству фермента, который катализирует фосфорилирование 1 мкмоль D-глюкозы до 6-фосфата D-глюкозы в минуту в условиях анализа. Активность глюкокиназы рассчитывается следующим образом:

Активность глюкокиназы (Ед/г общего белкового экстракта) = $dOD \times V / [dt \times l \times \epsilon \times Q_{prot}]$, где:

- dOD - изменение оптической плотности (OD) при 340 нм

- V - объем реакции (в настоящем документе 250 мкл)

dt=время измерения (в минутах)

l=длина оптического пути (в данном случае 0,73 см)

ϵ =молярный коэффициент ослабления NADPH; Н + (в настоящем документе 6220 см²/мкмоль)

Q_{prot}=количество белка в кювете (в г)

Измерения повторяли трижды для каждого образца, и значения удельной

активности глюкокиназы, приведенные в настоящем документе в тесте E, представляют собой среднее значение трех независимых экспериментов.

Высвобождение глюкозы лактозо-положительными, галактозо-отрицательными штаммами *Streptococcus thermophilus* по изобретению во время ферментации молока.

Как описано в настоящем документе, лактозо-положительные, галактозо-отрицательные штаммы *Streptococcus thermophilus* по изобретению могут дополнительно характеризоваться их способностью высвобождать глюкозу при использовании для ферментации молока. Эта способность определяется в настоящем документе концентрацией глюкозы, которая высвобождается в молоко, когда штамм по изобретению используется для ферментации молока. В одном варианте осуществления условия ферментации проводят согласно тесту B и концентрация высвобождаемой глюкозы определяется с помощью теста B, как определено ниже:

Тест B:

Полуобезжиренное молоко УНТ «Le Petit Vendéen» («йогуртовое молоко»), содержащее 3% (масс./об.) сухого молока (BBA, Lactalis), предварительно пастеризованное в течение 10 минут при 90 °C, инокулируется при 1% (об./об., примерно 10^7 КОЕ/мл) с использованием культуры штамма *S. thermophilus*, который подлежит анализу (ресуспендированные клетки без M17-углеводов из ночной культуры, выращенной в M17, с добавлением 3% сахарозы). В этом молоке содержится примерно 175 мМ лактозы. Инокулированные колбы с молоком статически инкубируют на водяной бане при 43°C в течение 24 часов для получения ферментированного молока. Образцы T0 и образцы ферментированного молока (T24ч) (5 г) разбавляют в 25 г 0,025 N H₂SO₄, а затем центрифугируют при 4600 об/мин в течение 10 минут при 4 °C. Супернатант фильтруют через нейлоновый фильтр 0,2 мкм (Phenomenex, Германия, Ашаффенбург) непосредственно во флакон для ВЭЖХ объемом 2 мл. Образцы хранят при -20°C до дальнейшего анализа. Углеводы количественно определяют с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ Agilent 1200), снабженной детектором показателя преломления, с использованием анионообменной колонки Aminex HPLC-87H (Bio-Rad Laboratories Inc.) при 35 °C, с 12,5 мМ H₂SO₄ в качестве элюирующей жидкости и со скоростью потока 0,6 мл·мин⁻¹. Использование результатов осуществляется с помощью программного обеспечения Chemstation для переработки данных (Agilent).

Во избежание сомнений, вид *Streptococcus thermophilus* следует понимать как штамм *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

Под выражением «лактозо-положительный» подразумевается штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен расти на лактозе как единственном источнике источника углеводов, в частности на среде M17, дополненной 2% лактозы. В конкретном варианте осуществления «лактозо-положительный» фенотип анализируют путем инокуляции - в бульон M17, содержащий 2% лактозы, - ночной культуры штамма *S. thermophilus*, подлежащей тестированию, на уровне 1%, и инкубации в течение 20 часов при 37 °C, и

где pH 5,5 или ниже в конце инкубации является показателем лактозо-положительного фенотипа.

Под выражением «галактозо-отрицательный» подразумевается штамм *Streptococcus thermophilus*, который не способен расти на галактозе как единственном источнике углеводов, в частности на среде M17, дополненной 2% галактозой. В конкретном варианте осуществления изобретения «галактозо-отрицательный» фенотип анализируют путем инокуляции в бульон M17, содержащий 2% галактозы, - ночной культуры штамма *S. thermophilus*, который подлежит тестированию, на уровне 1% и инкубируют в течение 20 часов при 37 °C, и где pH 6 или выше в конце инкубации указывает на галактозо-отрицательный фенотип.

Под выражением «производное» в отношении исходного штамма (например, производное DGCC7710) подразумевается штамм, полученный из исходного штамма (например, из штамма DGCC7710) заменой одного из его генов (таких как *glcK*, *ссрА*, ...) другим аллелем (в частности, мутированным аллелем) того же гена. В одном варианте осуществления производное получают заменой полного гена (кодирующей последовательности и промотора) исходного штамма другим аллелем (кодирующей последовательностью и промотором) того же гена. В другом варианте осуществления производное получают заменой кодирующей последовательности гена исходного штамма другим аллелем (кодирующей последовательностью) того же гена.

Настоящее изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, несущему мутацию в одном или более генах, выбранных из группы, состоящей из гена *glcK*, гена *ссрА*, гена *lacZ*, гена *ptsHgen*, и гена, кодирующего белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, где отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляет по меньшей мере 4×10^{-6} , по меньшей мере, 5×10^{-6} , по меньшей мере, 6×10^{-6} , по меньшей мере, 7×10^{-6} или, по меньшей мере, 8×10^{-6} . В одном варианте осуществления и при любом минимальном значении соотношения, как определено в настоящем документе, отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляет менее чем 8×10^{-3} .

В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет мутацию(и) в одном или более генах, выбранных из группы, состоящей из гена *glcK*, гена *ссрА*, гена *lacZ* и гена *ptsH* и, необязательно, мутацию в одном или более генах, в частности в одном гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-специфической PTS. В другом варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет мутацию(и) в одном или более генах, выбранных из группы, состоящей из гена *glcK*, гена *ссрА*, гена *lacZ* и гена *ptsH* и мутацию в одном или более генах, в частности, в одном гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-

специфической PTS. В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет 1) мутацию в гене, выбранном из группы, состоящей из гена *glcK*, гена *ссрА*, гена *lacZ* и гена *ptsH*, или мутацию в гене *glcK* и гене *ссрА*, и 2) мутацию в одном или более генах, в частности в одном гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-специфической PTS. В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет первую мутацию в гене, выбранном из группы, состоящей из гена *glcK*, гена *ссрА*, гена *lacZ* и гена *ptsH*, и вторую мутацию в гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-специфической PTS.

В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет мутацию в одном или более генах, выбранных из группы, состоящей из гена *glcK*, гена *ссрА* и гена, кодирующего белок маннозо-глюкозо-специфической PTS. В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет мутацию в гене *glcK* и/или гене *ссрА* и необязательно в одном или более генах, в частности, одном гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-специфической PTS.

В любом из приведенных выше вариантов осуществления один или более генов, кодирующих белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, выбран из группы, состоящей из гена *manL*, гена *manM*, гена *manN* и гена *manO*. В любом из приведенных выше вариантов осуществления один или более генов, кодирующих белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, выбран из группы, состоящей из гена *manL*, гена *manM* и гена *manN*. В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет мутацию(и) в гене или двух генах, выбранных из группы, состоящей из гена *glcK* и гена *ссрА*, и мутацию в одном или более генах, в частности, в одном гене, кодирующий белок маннозо-глюкозо-специфической PTS. В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет мутацию в гене *glcK* и/или гене *ссрА* и необязательно в гене *manL*, гене *manM* или гене *manN*.

Некоторые варианты осуществления лактозо-положительных, галактозо-отрицательных штаммов *Streptococcus thermophilus* по изобретению, демонстрирующих отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, по меньшей мере 4×10^{-6} , подробно описаны ниже:

I. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению, несущий мутацию в своем гене *glcK*.

II. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению, несущий мутацию в своем гене *ссрА*.

III. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению, несущий мутацию в своем гене *glcK* и мутацию в своем гене

сспА.

IV. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению, несущий мутацию в своем гене *lacZ*.

V. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению, несущий мутацию в своем гене *ptsH*.

VI. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению согласно любому из воплощений I-V, дополнительно несущий мутацию в одном или более генах, в частности в одном гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-специфической PTS.

I. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, несущий мутацию в своем гене *glcK*

В настоящем изобретении доказано, что штаммы *Streptococcus thermophilus*, которые являются галактозо-отрицательными и несут мутацию в гене *glcK*, кодирующем глюкокиназу (*GlcK*), активность которой в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю, можно использовать для выделения глюкозы в ферментированном молоке.

Изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, несущему мутацию в гене *glcK*, кодирующем глюкокиназу, активность которой в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю. В одном варианте осуществления изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, несущему мутацию в гене *glcK*, кодирующем глюкокиназу, активность которой в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю, где отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме согласно анализу с помощью теста E, составляет по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе.

Выражение «*glcK*gene, кодирующий глюкокиназу» означает любую последовательность ДНК *Streptococcus thermophilus*strain, кодирующую фермент глюкокиназу, который катализирует превращение глюкозы и АТФ в глюкозо-6-фосфат (G6P) и АДФ. Неограничивающие примеры последовательностей *Streptococcus thermophilus* glucokinase раскрыты как SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 12, 14, 16, 18 и 20.

В рамках изобретения активность глюкокиназы в *Streptococcus thermophilus*strain значительно снижена, но не равна нулю, как следствие мутации в ее гене *glcK*. Другими словами, аллель гена *glcK*, который несет указанный штамм, таков, что активность глюкокиназы в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю.

Выражение «активность глюкокиназы в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю» относится к штамму, активность глюкокиназы которого одновременно:

- значительно снижается в указанном штамме, в частности по сравнению с активностью глюкокиназы в штамме, несущем немутантный ген *glcK*; и

- не равна нулю, то есть, что активность детектируется с помощью теста А, как определено в настоящем документе.

Согласно изобретению признак «активность глюкокиназы в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю», может быть определен способами, хорошо известными в данной области. Таким образом, способы измерения активности глюкокиназы в *Streptococcus thermophilus* strain известны и включают ферментные анализы с коммерчески доступными реагентами. В настоящем документе делается ссылка на параграф 2.4 Pool et al. (2006. *Metabolic Engineering* 8 (5); 456-464) (включено в настоящее описание в качестве ссылки). В конкретном варианте осуществления для определения этого признака активность глюкокиназы в штамме *Streptococcus thermophilus* по изобретению анализируют с помощью теста А [т.е. тест А проводится с использованием штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению].

Тест А:

Получают свежую ночную культуру штамма *Streptococcus thermophilus* для анализа в М17, содержащей 30 г/л лактозы, и используют для инокуляции в 1% (об./об.) 10 мл свежей М17 с 30 г/л лактозы. Клетки собирают центрифугированием (6000 г, 10 мин, 4 °С) при оптической плотности при 600 нм (OD600) 0,8 +/- 0,2, промывают в 5 мл холодного буфера GLCK (5 mM MgCl₂, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ [pH 7,2]) и ресуспендируют в 500 мкл холодного буфера GLCK. Ингибиторы протеаз без EDTA «Omplete™» (Roche, ссылка поставщика 04693132001) добавляют в буфер GLCK, как описано поставщиком. Клетки разрушают добавлением 100 мг стеклянных гранул (150-212 мкм, Sigma G1145) к 200 мкл ресуспендированных клеток и колебаниям с частотой 30 циклов/с в течение 6 минут в ивбромельнице MM200 (Retsch, Наан, Германия). Клеточный дебрис и стеклянные гранулы удаляют центрифугированием (14000 г, 15 мин, 4 °С) и супернатант переносят в чистую пробирку для центрифугирования объемом 1,5 мл, которую держат на льду. Содержание общего белка определяют с использованием набора для определения белка FLUKA-Rapid (ref 51254). Активность глюкокиназы в клеточных экстрактах определяют спектрофотометрически с помощью глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G-6PDH, EC1.1.1.49): анализ, связанный с NADPH (Porter et al., 1982), по существу, как описано Pool et al., (2006). Каждый образец (5, 10 и 20 мкл) добавляют в буфер для анализа (10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ [pH 7,2], 5 mM MgCl₂, 1 mM АТР, 20 mM глюкозы, 1 mM NADP, 1 U G-6PDH) в 250 мкл конечного объема, и смесь оставляют на 5 мин при 30 °С. Оптическую плотность при 340 нм измеряют в течение 5 минут с помощью считывающего устройства для микропланшетов Synergy HT (БИО-ТЕК). Одна единица глюкокиназы соответствует количеству фермента, который катализирует фосфорилирование 1 мкмоль D-глюкозы до 6-фосфата D-глюкозы в минуту в условиях анализа. активность глюкокиназы рассчитывается следующим образом:

активность глюкокиназы (Ед/г общего белкового экстракта) = $dOD \times V / [dt \times l \times \epsilon \times Q_{prot}]$, где:

- dOD - изменение оптической плотности (OD) при 340 нм
- V - объем реакции (в настоящем документе 250 мкл)
- dt=время измерения (в минутах)

- l = длина оптического пути (в данном случае 0,73 см)

- ϵ = молярный коэффициент ослабления NADPH; Н + (в настоящем документе 6220 см²/мкмоль)

Q_{prot} = количество белка в кювете (в г)

Измерения повторяют трижды для каждого образца, и значения удельной активности глюкокиназы, приведенные в настоящем документе в тесте А, являются средними значениями трех независимых экспериментов.

В первом конкретном варианте осуществления признака «активность глюкокиназы в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю», активность глюкокиназы в штамме *Streptococcus thermophilus* по изобретению составляет от 200 до 1500 Ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста А. В конкретном варианте осуществления активность глюкокиназы в штамме *Streptococcus thermophilus* по изобретению составляет от 300 до 1200 Ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста А. В конкретном варианте осуществления активность глюкокиназы в штамме *Streptococcus thermophilus* изобретение составляет от 400 до 1000 Ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста А. В конкретном варианте осуществления активность глюкокиназы в штамме *Streptococcus thermophilus* по изобретению находится между минимальным значением, выбранным из группы, состоящей из 200, 300 и 400 ед/г общего белкового экстракта, и максимальным значением, выбранным из группы, состоящей из 1000, 1200 и 1500 ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста А. Следует отметить, что, как упоминалось в тесте А, значения активности глюкокиназы, раскрытые в настоящем документе, являются средними значениями трех независимых экспериментов (повторение три раза).

Во втором конкретном варианте осуществления функции «активность глюкокиназы в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю», активность глюкокиназы в *Streptococcus thermophilus* strain по изобретению составляет от 5 до 60% активности глюкокиназы штамма DGCC7710, депонированного в DSMZ под номером доступа DSM28255 от 14 января 2014 года. Под «глюкокиназной активностью штамма DGCC7710» подразумевается активность глюкокиназы штамма DGCC7710 (то есть с SEQ ID NO: 2), согласно анализу с помощью теста А в штамме DGCC7710 [т.е. тест А проводится с использованием штамма DGCC7710]. Процентное значение рассчитывают на основе активности глюкокиназы в штамме по изобретению и активности глюкокиназы штамма DGCC7710, которые анализируют с помощью теста А. В конкретном варианте осуществления активность глюкокиназы в штамме *Streptococcus thermophilus* по изобретению составляет от 10 до 50% активности глюкокиназы штамма DGCC7710. В конкретном варианте осуществления активность глюкокиназы в штамме *Streptococcus thermophilus* по изобретению составляет от 15 до 40% активности глюкокиназы штамма DGCC7710. В конкретном варианте осуществления активность глюкокиназы штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению находится между минимальным процентом, выбранным из группы, состоящей из 5, 10 и 15% активности глюкокиназы штамма

DGCC7710, и максимальным процентным значением, выбранным из группы, состоящей из 40, 50 и 60% активности глюкокиназы штамма DGCC7710. В конкретном варианте осуществления и независимо от диапазона процентных показателей активность глюкокиназы анализируют с помощью теста А, как описано в настоящем документе. Следует отметить, что процентные значения, раскрытые в настоящем документе, рассчитываются на основе значений активности глюкокиназы, которые являются средними значениями для трех независимых экспериментов (повторение три раза), согласно анализу с помощью теста А.

В первом и втором конкретных вариантах осуществления в качестве контролей в тесте А могут использоваться следующие штаммы:

- в качестве положительного контроля (то есть штамм *Streptococcus thermophilus*, являющийся представителем штаммов, несущих немутантный ген *glcK*): штамм DGCC7710, депонированный в DSMZ под номером доступа DSM28255 14 января 2014 г.;

- в качестве отрицательного контроля (то есть штамм *Streptococcus thermophilus*, не обладающий детектируемой глюкокиназной активностью): либо чей ген *glcK* *Streptococcus thermophilus* нокаутирован, либо ген *glcK* *Streptococcus thermophilus*, который несет одну из мутаций, описанных в WO2013/160413, WO2017/103051 или Sørensen et al. (2016) и суммированы в Таблице 1 ниже:

Мутация на уровне гена <i>glcK</i>	Изменение на уровне белка <i>GlcK</i>	Мутация, описанная в депонированном штамме	Штаммы описаны в
T214C	S72P	DSM25851	WO2013/160413
C422T	T141I	DSM25850	WO2013/160413 Sørensen (St1-GS-1)
G745A	G249R	DSM28889	WO2017/103051 Sørensen (St2-GS-1)

Таблица 1: мутации *glcK*, приводящие к штамму, активность глюкокиназы которого не детектируется

Во время ферментации молока содержащаяся в молоке лактоза (как основной источник углеводов в молоке) импортируется в штаммы *Streptococcus thermophilus*. Затем внутриклеточная лактоза расщепляется на глюкозу и галактозу ферментом бета-галактозидазы (так что 1 моль лактозы дает 1 моль глюкозы и 1 моль галактозы).

Признак «активность глюкокиназы в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю», также может быть охарактеризована максимальной скоростью прямой реакции глюкокиназы (в настоящем документе называемой V_{max} и определяемой как скорость превращения глюкозы+АТФ в $G6P+ADP$) или обратным превращением аффинности глюкокиназы (называемой K_m) для одного или двух ее субстратов, т.е. глюкозы и АТФ. В одном варианте осуществления признак «активность глюкокиназы в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю» для штамма по изобретению, кроме того, характеризуется максимальной скоростью (V_{max}) его глюкокиназы в указанном штамме.

Следовательно, в комбинации с первым или вторым конкретным вариантом

осуществления признака «активность глюкокиназы в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю», определенного в настоящем документе, максимальная скорость прямой реакции (V_{max}) глюкокиназы в лактозо-положительном, галактозо-отрицательном штамме *Streptococcus thermophilus* по изобретению значительно снижена, но не равна нулю. Признак « V_{max} глюкокиназы в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю», может быть определен одним или двумя из следующих параметров:

- V_{max} составляет от 200 до 1500 Ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста С.

- V_{max} составляет от 5 до 60% от V_{max} глюкокиназы штамма DGCC7710, депонированного в DSMZ под номером доступа DSM28255 14 января 2014 года, когда обе были проанализированы с помощью теста С.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, несущему мутацию в гене *glcK*, кодирующем глюкокиназу, где активность глюкокиназы в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю (как определено в настоящем документе) и где максимальная скорость прямой реакции (V_{max}) его глюкокиназы в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю и определяется одним или двумя из этих параметров:

- V_{max} составляет от 200 до 1500 Ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста С.

- V_{max} составляет от 5 до 60% от V_{max} глюкокиназы штамма DGCC7710, депонированного в DSMZ под номером доступа DSM28255 14 января 2014 года, когда обе были проанализированы с помощью теста С.

Максимальная скорость прямой реакции глюкокиназы (V_{max}) в *Streptococcus thermophilus* по изобретению оценивается с помощью теста С [т.е. тест С проводится с использованием штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению].

Тест С:

Максимальная скорость прямой реакции (V_{max}) определяется с использованием различных концентраций глюкозы (0, 5, 10, 15, 20 мМ) в неочищенном экстракте, приготовленном, как описано в тесте А. Измерения для каждой пробы повторяли три раза, а значения V_{max} , приведенные согласно тесту С, представляют собой среднее значение трех независимых экспериментов. Линейная регрессия, представляющая обратную удельную скорость в зависимости от обратной концентрации глюкозы, дает обратную максимальную скорость прямой реакции на пересечении с осью Y графика.

В конкретном варианте осуществления максимальной скорости прямой реакции глюкокиназы в штамме *Streptococcus thermophilus* по изобретению, V_{max} составляет от 200 до 1500 Ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста С. В конкретном варианте осуществления V_{max} составляет от 300 до 1200 Ед/г экстракта общего белка, согласно анализу С. В конкретном варианте осуществления V_{max}

составляет от 400 до 1000 Ед/г экстракта общего белка. В конкретном варианте осуществления V_{max} глюкокиназы в штамме *Streptococcus thermophilus* по изобретению находится между минимальным значением, выбранным из группы, состоящей из 200, 300 и 400 Ед/г общего белкового экстракта, и максимальным значением, выбранным из группы, состоящей из 1000, 1200 и 1500 Ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста С.

В конкретном варианте осуществления максимальной скорости прямой реакции глюкокиназы в штамме *Streptococcus thermophilus* по изобретению V_{max} составляет от 5 до 60% от V_{max} глюкокиназы штамма DGCC7710. Под « V_{max} глюкокиназы штамма DGCC7710» подразумевается V_{max} глюкокиназы штамма DGCC7710 (то есть с SEQ ID NO: 2), согласно анализу с помощью теста С в штамме DGCC 7710 [т.е. тест С проводится с использованием штамма DGCC7710]. Процентное значение рассчитывают на основе V_{max} глюкокиназы в штамме по изобретению и V_{max} штамма DGCC7710, которые анализируют с помощью теста С. В конкретном варианте осуществления V_{max} глюкокиназы в штамме *Streptococcus thermophilus* по изобретению находится составляет от 10 до 50% V_{max} глюкокиназы штамма DGCC7710, когда их анализируют тестом С. В конкретном варианте осуществления V_{max} глюкокиназы в штамме *Streptococcus thermophilus* по изобретению составляет от 15 до 40% V_{max} глюкокиназы штамма DGCC7710. В конкретном варианте осуществления V_{max} глюкокиназы в штамме *Streptococcus thermophilus* по изобретению находится между минимальным процентным значением, выбранным из группы, состоящей из 5, 10 и 15% V_{max} активности глюкокиназы штамма DGCC7710, и максимальным процентным значением, выбранным из группы, состоящей из 40, 50 и 60% V_{max} активности глюкокиназы штамма DGCC7710.

Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет мутацию в гене *glcK*, кодирующем глюкокиназу, активность глюкокиназы которого в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю, как определено в настоящем документе, и необязательно, где максимальная скорость прямой реакции глюкокиназы в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю, как определено в настоящем документе.

Под «мутацией в гене *glcK*» в рамках настоящего изобретения подразумевается любое изменение нуклеотида в гене *glcK*, где указанное изменение на уровне нуклеотидов приводит к активности глюкокиназы в штамме, несущем этот мутированный ген *glcK* (в качестве единственного гена *glcK*), которая значительно снижена, но не равна нулю, как определено в настоящем документе, и необязательно приводит к максимальной скорости прямой реакции глюкокиназы в указанном штамме, которая значительно снижена, но не равна нулю, как определено в настоящем документе. В конкретном варианте осуществления под «мутацией в гене *glcK*» в рамках настоящего изобретения подразумевается любое изменение нуклеотида в открытой рамке считывания гена *glcK*, где указанное изменение на уровне нуклеотида приводит к активности глюкокиназы в штамме, несущем этот мутированный ген *glcK* (в качестве единственного гена *glcK*),

которая значительно снижена, но не равна нулю, как определено в настоящем документе, и необязательно приводит к такой максимальной скорости прямой реакции глюкокиназы в указанном штамме, которая значительно снижена, но не равна нулю, как определено в настоящем документе.

Таким образом, хотя два штамма *Streptococcus thermophilus* могут различаться по последовательности их соответствующего гена *glcK*, это не обязательно означает, что один из этих двух генов *glcK* мутирован в смысле изобретения. Действительно, в рамках настоящего изобретения в качестве мутаций не рассматриваются:

- вариации на уровне нуклеотидов, которые не приводят к каким-либо изменениям на уровне белка (молчащие вариации) и которые не влияют на трансляцию РНК *glcK*; и

- вариации на уровне нуклеотидов, которые приводят к изменению на уровне белка, но при этом это изменение не влияет на активность глюкокиназы полученного белка *GlcK* и, необязательно, максимальную скорость прямой реакции получаемого в результате белка *GlcK*, как определено в настоящем документе. Действительно, такие изменения могут наблюдаться на уровне гена *glcK* *Streptococcus thermophilus* по изобретению без влияния на объем притязаний.

Неограничивающими примерами генов *glcK*, которые не считаются мутированными в смысле изобретения, являются:

- полинуклеотид, кодирующий глюкокиназу, как определено в SEQ ID NO: 2 (*GlcK* тип ST1), в частности, полинуклеотид, как определено в SEQ ID NO: 1; этот тип *GlcK* относится к штамму DGCC7710, депонированному в DSMZ под номером доступа DSM28255 14 января 2014 г.;

- полинуклеотид, кодирующий глюкокиназу, как определено в SEQ ID NO: 4 (*GlcK* тип ST2), в частности, полинуклеотид, как определено в SEQ ID NO: 3;

- полинуклеотид, кодирующий глюкокиназу, как определено в SEQ ID NO: 6 (*GlcK* тип ST3), в частности, полинуклеотид, как определено в SEQ ID NO: 5;

- полинуклеотид, кодирующий глюкокиназу, как определено в SEQ ID NO: 8 (*GlcK* тип ST4), в частности, полинуклеотид, как определено в SEQ ID NO: 7;

- полинуклеотид, кодирующий глюкокиназу, как определено в SEQ ID NO: 10 (*GlcK* тип ST5), в частности, полинуклеотид, как определено в SEQ ID NO: 9;

- полинуклеотид, кодирующий глюкокиназу, как определено в SEQ ID NO: 12 (*GlcK* тип ST6), в частности, полинуклеотид, как определено в SEQ ID NO: 11;

- полинуклеотид, кодирующий глюкокиназу, как определено в SEQ ID NO: 14 (*GlcK* тип ST7), в частности, полинуклеотид, как определено в SEQ ID NO: 13;

- полинуклеотид, кодирующий глюкокиназу, как определено в SEQ ID NO: 16 (*GlcK* тип ST8), в частности, полинуклеотид, как определено в SEQ ID NO: 15;

- полинуклеотид, кодирующий глюкокиназу, как определено в SEQ ID NO: 18 (*GlcK* тип ST9), в частности, полинуклеотид, как определено в SEQ ID NO: 17;

- полинуклеотид, кодирующий глюкокиназу, как определено в SEQ ID NO: 20 (*GlcK* тип ST10), в частности, полинуклеотид, как определено в SEQ ID NO: 19.

Различия аминокислот на уровне глюкокиназы вместе с процентом идентичности каждого типа GlcK с SEQ ID NO: 2 суммированы в Таблице 3 (пример 2). Активность глюкокиназы в штаммах GlcK типов ST2 - ST10 суммирована в Таблице 4 (пример 3).

Кроме того, некоторые нуклеотидные мутации в гене *glcK* не считаются подходящими для цели изобретения, поскольку они приводят к глюкокиназе, активность которой равна нулю или находится ниже минимального значения, определенного в настоящем документе, согласно анализу с помощью теста А. Неограничивающие примеры непригодных мутаций описаны в Таблице 1. В одном варианте осуществления *Streptococcus thermophilus* по изобретению не несет мутации, выбранной из группы, состоящей из мутации, приводящей к нокауту гена *glcK* и большим делециям в гене *glcK*.

В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет мутацию в открытой рамке считывания гена *glcK*, приводящую к замене аминокислоты в белке GlcK, активность глюкокиназы которого в указанном штамме, содержащем мутантный ген *glcK*, значительно снижена, но не равна нулю (как определено в настоящем документе), и необязательно, где максимальная скорость прямой реакции глюкокиназы в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю, как определено в настоящем документе. В конкретном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению несет мутацию в гене *glcK*, приводящую к замене аминокислоты в белке GlcK, где активность глюкокиназы в указанном штамме, несущем мутированный *glcK* ген, значительно снижена, но не равна нулю (как определено в настоящем документе), и необязательно, где максимальная скорость прямой реакции глюкокиназы в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю, как определено в настоящем документе. В конкретном варианте осуществления штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет мутацию в гене *glcK*, так что белок GlcK имеет длину 322 аминокислоты, и где активность глюкокиназы в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю, как определено в настоящем документе, и необязательно, где максимальная скорость прямой реакции глюкокиназы в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю, как определено в настоящем документе.

Как обсуждалось выше, некоторые модификации ДНК могут наблюдаться на уровне гена *glcK* *Streptococcus thermophilus* по изобретению, которые не влияют на активность глюкокиназы штамма. На основании теста А, определенного в настоящем документе, вместе с контрольными штаммами, определенными в настоящем документе, специалист в данной области техники будет знать, как идентифицировать 1) ген *glcK*, кодирующий глюкокиназу, активность которой в штамме, несущем этот ген *glcK*, значительно снижена, но не равна нулю (как определено в настоящем документе), и необязательно, где максимальная скорость прямой реакции глюкокиназы в штамме, несущем этот мутированный ген *glcK*, значительно снижена, но не равна нулю (как определено в настоящем документе), 2) ген *glcK*, несущий модификацию, не влияющую

на активность глюкокиназы в штамме, несущем эту модификацию, или 3) ген *glcK*, кодирующий глюкокиназу, активность которой в штамме, несущем этот ген *glcK*, равна нулю (как определено в настоящем документе).

Штамм DGCC7710 можно использовать в качестве контроля, путем замены его гена *glcK* на ген *glcK*, который необходимо проанализировать, с получением производного DGCC7710, и путем анализа производного DGCC7710 с помощью теста А (активность глюкокиназы) или теста С (V_{max}).

Авторы изобретения определили два положения внутри глюкокиназы, для которых было показано, что природа аминокислот влияет на активность глюкокиназы, так что активность глюкокиназы значительно снижается, но не равна нулю, как определено в настоящем документе, и влияет на V_{max} глюкокиназы, так что V_{max} значительно снижается, но не равна нулю, как определено в настоящем документе: положение 144 и положение 275 глюкокиназы (т.е. кодоны 144 и 275 гена *glcK*). Следует отметить, что на основании тестов А и С, определенных в настоящем документе, вместе с контрольными штаммами, специалист в данной области техники должен знать, как идентифицировать другие положения и подходящие аминокислоты в глюкокиназе, чтобы получить активность глюкокиназы, которая значительно снижена, но не равна нулю (как определено в настоящем документе) и, необязательно, такую максимальную скорость прямой реакции, которая значительно снижена, но не равна нулю, и, следовательно, соответствующий ген *glcK*.

В одном варианте осуществления аминокислота в положении 275 глюкокиназы (кодируемой геном *glcK* штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению) не является глутаминовой кислотой (т.е. является любой аминокислотой, кроме глутаминовой кислоты); таким образом, в одном варианте осуществления кодон 275 гена *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, не является ни GAA, ни GAG. В конкретном варианте осуществления аминокислота в положении 275 глюкокиназы не является кислой аминокислотой (то есть является любой аминокислотой, кроме кислой аминокислоты); таким образом, в одном варианте осуществления кодон 275 гена *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, представляет собой кодон, кодирующий аминокислоту без кислотных свойств. В конкретном варианте осуществления аминокислота в положении 275 глюкокиназы выбрана из группы, состоящей из лизина и любой из его консервативных аминокислот; таким образом, в одном варианте осуществления кодон 275 гена *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, представляет собой кодон, кодирующий аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из лизина и любой из его консервативных аминокислот. В конкретном варианте осуществления аминокислота в положении 275 глюкокиназы представляет собой лизин; таким образом, в одном варианте осуществления кодон 275 гена *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, представляет собой либо AAA, либо AAG. В конкретном варианте осуществления нуклеотиды 823-825 гена *glcK*, переносимого штаммом *Streptococcus*

thermophilus по изобретению, представляют собой AAA или AAG.

В конкретном варианте осуществления последовательность белка GlcK лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению выбрана из группы, состоящей из:

а) последовательности, как определено в SEQ ID NO: 25, где аминокислотой в положении 275 является любая аминокислота, кроме глутаминовой кислоты, в частности, является любой аминокислотой, за исключением кислой аминокислоты, в частности, представляет собой лизин; и

б) вариантной последовательности GlcK, имеющей, по меньшей мере, 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 25, где аминокислота глюкокиназы, соответствующая положению 275 SEQ ID NO: 25 (или аминокислота в положении 275 глюкокиназы), представляет собой любую аминокислоту, кроме глутаминовой кислоты, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме кислой аминокислоты, в частности, представляет собой лизин. В одном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK имеет длину 322 аминокислоты.

В другом варианте осуществления аминокислота в положении 144 глюкокиназы (кодируемой геном *glcK* штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению) не является глицином (то есть является любой аминокислотой, кроме глицина); таким образом, в одном варианте осуществления кодон 144 гена *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, не является GGT, GGC, GGA или GGG. В конкретном варианте осуществления аминокислота в положении 144 глюкокиназы не является алифатической аминокислотой (то есть является любой аминокислотой, кроме алифатической аминокислоты). В конкретном варианте осуществления аминокислота в положении 144 глюкокиназы выбрана из группы, состоящей из серина и любой из его консервативных аминокислот; таким образом, в одном варианте осуществления кодон 144 гена *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, представляет собой кодон, кодирующий аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из серина и любой из его консервативных аминокислот. В конкретном варианте осуществления аминокислота в положении 144 глюкокиназы представляет собой серин; таким образом, в одном варианте осуществления кодон 144 гена *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, представляет собой AGT, AGC, TCT, TCC, TCA или TCG. В конкретном варианте осуществления нуклеотиды 430-432 гена *glcK*, переносимые штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, представляют собой AGT, AGC, TCT, TCC, TCA или TCG.

В конкретном варианте осуществления последовательность белка GlcK лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению выбрана из группы, состоящей из:

а) последовательности, как определено в SEQ ID NO: 46, где аминокислота в положении 144 представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме алифатической аминокислоты, в

частности, представляет собой серин; и

б) вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 46, где аминокислота глюкокиназы, соответствующая положению 144 SEQ ID NO: 46 (или аминокислота в положении 144 глюкокиназы), представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме алифатической аминокислоты, в частности, представляет собой серин. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK имеет длину 322 аминокислоты.

Для определения варианта GlcK, имеющего по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 25, сходство или идентичность рассчитывают в настоящем документе по всей длине 2 последовательностей после оптимального выравнивания [т.е. количество сходных или идентичных аминокислотных остатков в выровненных частях последовательностей]; положение 275, как определено в SEQ ID NO: 25, не рассматривается для расчета сходства или идентичности. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK имеет по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 25, где аминокислота, соответствующая положению 275 SEQ ID NO: 25 (или аминокислота в положении 275 глюкокиназы), представляет собой любую аминокислоту, кроме глутаминовой кислоты, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме кислой аминокислоты, в частности, представляет собой лизин. В одном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK имеет по меньшей мере 95% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 25, где аминокислота, соответствующая положению 275 SEQ ID NO: 25 (или аминокислота в положении 275 глюкокиназы), представляет собой любую аминокислоту, кроме глутаминовой кислоты, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме кислой аминокислоты, в частности, представляет собой лизин. В одном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK имеет по меньшей мере 97% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 25, где аминокислота, соответствующая положению 275 SEQ ID NO: 25 (или аминокислота в положении 275 глюкокиназы), представляет собой любую аминокислоту, кроме глутаминовой кислоты, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме кислой аминокислоты, в частности, представляет собой лизин.

В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK отличается от SEQ ID NO: 25 заменой аминокислот от 1 до 30, где аминокислота в положении 275 указанного варианта GlcK представляет собой любую аминокислоту, кроме глутаминовой кислоты, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме кислой аминокислоты, в частности, представляет собой лизин (положение 275 не учитывается для расчета количества замен). В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK отличается от SEQ ID NO: 25 заменами аминокислот от 1 до 20, где аминокислота в положении 275 указанного варианта GlcK представляет собой любую аминокислоту, кроме глутаминовой кислоты, в частности, представляет

собой любую аминокислоту, кроме кислой аминокислоты, в частности, представляет собой лизин. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK отличается от SEQ ID NO: 25 заменой аминокислот от 1 до 15, где аминокислота в положении 275 указанного варианта GlcK представляет собой любую аминокислоту, кроме глутаминовой кислоты, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме кислой аминокислоты, в частности, представляет собой лизин. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK отличается от SEQ ID NO: 25 заменой аминокислот от 1 до 10, где аминокислота в положении 275 указанного варианта GlcK представляет собой любую аминокислоту, кроме глутаминовой кислоты, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме кислой аминокислоты, в частности, представляет собой лизин. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK отличается от SEQ ID NO: 25 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотными заменами, где аминокислота в положении 275 указанного варианта GlcK представляет собой любую аминокислоту, кроме глутаминовой кислоты, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме кислой аминокислоты, в частности, представляет собой лизин.

Для определения варианта GlcK, имеющего по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 46, сходство или идентичность рассчитывают в настоящем документе по всей длине 2 последовательностей после оптимального выравнивания [то есть количество сходных или идентичных аминокислотных остатков в выровненных частях последовательностей]; положение 144, как определено в SEQ ID NO: 46, не учитывается для расчета сходства или идентичности. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK имеет по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 46, где аминокислота соответствует положению 144 SEQ ID NO: 46 (или аминокислота в положении 144 глюкокиназы) представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме алифатической аминокислоты, в частности, представляет собой серин. В одном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK имеет по меньшей мере 95% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 46, где аминокислота, соответствующая положению 144 SEQ ID NO: 46 (или аминокислота в положении 144 глюкокиназы), представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме алифатической аминокислоты, в частности, представляет собой серин. В одном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK имеет по меньшей мере 97% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 46, где аминокислота, соответствующая положению 144 SEQ ID NO: 46 (или аминокислота в положении 144 глюкокиназы), представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме алифатической аминокислоты, в частности, представляет собой серин.

В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK

отличается от SEQ ID NO: 46 заменами аминокислот от 1 до 30, где аминокислота в положении 144 указанного варианта GlcK представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме алифатической аминокислоты, в частности, представляет собой серин (положение 144 не учитывается для расчета количества замен). В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK отличается от SEQ ID NO: 46 1-20 аминокислотными заменами, где аминокислота в положении 144 указанного варианта GlcK представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме алифатической аминокислоты, в частности, представляет собой серин. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK отличается от SEQ ID NO: 46 1-15 аминокислотными заменами, где аминокислота в положении 144 указанного варианта GlcK представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме алифатической аминокислоты, в частности, представляет собой серин. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK отличается от SEQ ID NO: 46 1-10 аминокислотными заменами, где аминокислота в положении 144 указанного варианта GlcK представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме алифатической аминокислоты, в частности, представляет собой серин. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK отличается от SEQ ID NO: 46 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотными заменами, где аминокислота в положении 144 указанного варианта GlcK представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме алифатической аминокислоты, в частности, представляет собой серин.

В одном варианте осуществления последовательность белка GlcK лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 и 34, где аминокислота в положении 275 указанного варианта представляет собой любую аминокислоту, кроме глутаминовой кислоты, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме кислой аминокислоты, в частности, представляет собой лизин; таким образом, в одном варианте осуществления ген *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, кодирует белок GlcK, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 и 34, где аминокислота в положении 275 глюкокиназы не является глутаминовой кислотой, в частности, не является аминокислотой с кислотными свойствами, в частности, является лизином, соответственно.

В конкретном варианте осуществления либо в виде SEQ ID NO: 25, либо в любой вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 25, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34), аминокислота глюкокиназы, соответствующая

положению 275 SEQ ID NO: 25 (или аминокислота в положении 275 глюкокиназы), не является глутаминовой кислотой; таким образом, в одном варианте осуществления кодон 275 гена *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, не является ни GAA, ни GAG; таким образом, в одном варианте осуществления ген *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, кодирует белок GlcK, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25 и любой вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 25, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34), где аминокислота глюкокиназы соответствует положению 275 SEQ ID NO: 25 (или аминокислота в положении 275 глюкокиназы) не является глутаминовой кислотой.

В конкретном варианте осуществления либо в виде SEQ ID NO: 25, либо в любой вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 25, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34) аминокислота глюкокиназы, соответствующая положению 275 SEQ ID NO: 25 (или аминокислота в положении 275 глюкокиназы), не является кислой аминокислотой; таким образом, в одном варианте осуществления кодон 275 гена *glcK*, переносимого штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, представляет собой кодон, который не кодирует кислую аминокислоту, таким образом, в одном варианте осуществления ген *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению кодирует белок GlcK, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25 и любой вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 25, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34), где аминокислота глюкокиназы, соответствующая положению 275 SEQ ID NO: 25 (или аминокислота в положении 275 глюкокиназы), не является аминокислотой с кислотными свойствами.

В конкретном варианте осуществления либо в виде SEQ ID NO: 25, либо в любой вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 25, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34), аминокислота глюкокиназы, соответствующая положению 275 SEQ ID NO: 25 (или аминокислота в положении 275 глюкокиназы), выбрана из группы, состоящей из лизина и любой из его консервативных аминокислот; таким образом, в одном варианте осуществления кодон 275 гена *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, представляет собой кодон, кодирующий аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из лизина и любой из его консервативных аминокислот; таким образом, в одном варианте осуществления ген *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, кодирует белок GlcK, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25 и любой вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или

идентичности с SEQ ID NO: 25, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34), где аминокислота глюкокиназы соответствует положению 275 SEQ ID NO: 25 (или аминокислота в положении 275 глюкокиназы) представляет собой лизин и любую из его консервативных аминокислот.

В конкретном варианте осуществления либо в виде SEQ ID NO: 25, либо в любой вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 25, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34), аминокислота глюкокиназы, соответствующая положению 275 SEQ ID NO: 25 (или аминокислота в положении 275 глюкокиназы), представляет собой лизин; таким образом, в одном варианте осуществления кодон 275 гена *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, представляет собой кодон, кодирующий лизин, соответственно, в частности, AAA или AAG, соответственно; таким образом, в конкретном варианте осуществления последовательность белка GlcK лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 и 43; таким образом, в одном варианте осуществления ген *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, кодирует белок GlcK, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 и 43; в конкретном варианте осуществления ген *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, является таким, как определено в SEQ ID NO: 21.

В другом варианте осуществления последовательность белка GlcK лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 и 55, где аминокислота в положении 144 указанного варианта представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме алифатической аминокислоты, в частности, представляет собой серин; таким образом, в одном варианте осуществления ген *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, кодирует белок GlcK, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 и 55, где аминокислота в положении 144 глюкокиназы не является глицином, в частности не является алифатической аминокислотой, в частности представляет собой серин.

В конкретном варианте осуществления либо в виде SEQ ID NO: 46, либо в любой вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 46, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 или 55), аминокислота глюкокиназы, соответствующая положению 144 SEQ ID NO: 46 (или аминокислота в положении 144 глюкокиназы), не является глицином; таким образом, в одном варианте осуществления кодон 144 гена *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, не является GGT, GGC, GGA или GGG; таким образом, в одном варианте осуществления ген *glcK*,

переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, кодирует белок GlcK, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46 и любой вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 46, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 или 55), где аминокислота глюкокиназы, соответствующая положению 144 SEQ ID NO: 46 (или аминокислота в положении 144 глюкокиназы), не является глицином.

В конкретном варианте осуществления либо в виде SEQ ID NO: 46, либо в любой вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 46, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 или 55), аминокислота глюкокиназы, соответствующая положению 144 SEQ ID NO: 46 (или аминокислота в положении 144 глюкокиназы), не является алифатической аминокислотой; таким образом, в одном варианте осуществления кодон 144 гена *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, представляет собой кодон, который не кодирует алифатическую аминокислоту; таким образом, в одном варианте осуществления ген *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, кодирует белок GlcK, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46 и любой вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 46, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 или 55), где аминокислота глюкокиназы, соответствующая положению 144 SEQ ID NO: 46 (или аминокислота в положении 144 глюкокиназы), не является алифатической аминокислотой.

В конкретном варианте осуществления либо в виде SEQ ID NO: 46, либо в любой вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 46, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 или 55), аминокислота глюкокиназы, соответствующая положению 144 SEQ ID NO: 46 (или аминокислота в положении 144 глюкокиназы), выбрана из группы, состоящей из серина и любого из его консервативные аминокислоты; таким образом, в одном варианте осуществления кодон 144 гена *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, представляет собой кодон, кодирующий аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из серина и любой из его консервативных аминокислот; таким образом, в одном варианте осуществления ген *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, кодирует белок GlcK, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46 и любой вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 46, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 или 55), где аминокислота глюкокиназы, соответствующая положению 144 SEQ ID NO: 46 (или аминокислота в положении 144 глюкокиназы), представляет собой серин и любую из его консервативных аминокислот.

В конкретном варианте осуществления либо в виде SEQ ID NO: 46, либо любой вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 46, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 или 55), аминокислота глюкокиназы, соответствующая положению 144 SEQ ID NO: 46 (или аминокислота в положении 144 глюкокиназы), представляет собой серин; таким образом, в одном варианте осуществления кодон 144 гена *glcK*, переносимого штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, представляет собой кодон, кодирующий серин, в частности, AAA или AAG; таким образом, в конкретном варианте осуществления последовательность белка GlcK лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 и 64; таким образом, в одном варианте осуществления ген *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, кодирует белок GlcK, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 и 64; в конкретном варианте осуществления ген *glcK*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, является таким, как определено в SEQ ID NO: 44.

При определении последовательности белка GlcK лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению, согласно изложенному в настоящей заявке, активность глюкокиназы в штамме, экспрессирующем этот белок GlcK, значительно снижается, но не равна нулю, так как определено в настоящем документе и необязательно, что V_{max} глюкокиназы в этом штамме значительно снижена, но не равно нулю, как определено в настоящем документе.

Кроме характеристики в виде значительно сниженной, но не равной нулю активности глюкокиназы, как определено в настоящем документе, и, необязательно, значительно сниженной, но не равной нулю максимальной скорости прямой реакции (V_{max}) глюкокиназы, как определено в настоящем документе, лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* может быть дополнительно охарактеризован его поведением (способностью высвобождать глюкозу) при использовании для ферментации молока. Кроме отношения активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, которая составляет по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе, лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* может дополнительно характеризоваться его поведением (способностью высвобождать глюкозу) при использовании для ферментации молока. Кроме характеристики в виде отношения активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, в отношении активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, которое составляет по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе, и значительно сниженной, но не равной нулю активности глюкокиназы, как определено в настоящем документе, и, необязательно, значительно сниженной, но не равной нулю максимальной скорости

прямой реакции (V_{max}) его глюкокиназы, как определено в настоящем документе, лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* может быть дополнительно охарактеризован его поведением (способностью к высвобождению глюкозы) при использовании для ферментации молока.

Таким образом, лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, несущий мутацию в гене *glcK* по изобретению, дополнительно характеризуется по меньшей мере одним из этих признаков при использовании для ферментации молока, в частности одним из этих признаков или комбинацией этих двух признаков:

1) когда указанный штамм используют для ферментации молока, согласно анализу с помощью теста В, отношение количества накопленной/высвобожденной глюкозы (мМ) в указанном ферментированном молоке к количеству потребленной лактозы указанным штаммом (мМ) составляет более чем 20%;

2) когда указанный штамм используют для ферментации молока, согласно анализу с помощью теста В, концентрация глюкозы в указанном ферментированном молоке составляет по меньшей мере 10 мМ;

Каждый из этих признаков будет описан ниже отдельно, хотя, как указано выше, лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению, обладающий значительно сниженной, но не равной нулю активностью глюкокиназы, как определено в настоящем документе, и необязательно имеющий значительно сниженную максимальную скорость прямой реакции (V_{max}) его глюкокиназы, как определено в настоящем документе, может быть дополнительно охарактеризована одним из этих признаков или комбинацией этих двух признаков.

1) В конкретном варианте осуществления (отдельно или в комбинации с признаком 2) штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению, несущий мутацию в гене *glcK*, дополнительно характеризуется тем фактом, что когда указанный штамм используют для ферментации молока, согласно анализу с помощью теста В, отношение количества накопленной/высвобожденной глюкозы (мМ) в указанном ферментированном молоке к количеству потребленной лактозы указанным штаммом (мМ) составляет более чем 20%.

Действительно, в результате «значительно сниженной, но не равной нулю» активности глюкокиназы в штамме по изобретению и, необязательно, в результате «значительно сниженной, но не равной нулю» V_{max} глюкокиназы в указанном штамме, менее чем 80% моль глюкозы, поступающей из потребляемой лактозы (дисахарид, состоящий из глюкозы и галактозы), используются этим штаммом, так что по меньшей мере 20% моль глюкозы, поступающей из потребляемой лактозы, высвобождается в молоко во время ферментации. После ферментации молока с использованием теста В, описанного в настоящем документе, количество молей потребляемой лактозы определяют путем расчета количества молей лактозы в молоке до ферментации минус количество молей лактозы, оставшихся в ферментированном молоке после ферментации. После ферментации молока с использованием теста В, описанного в настоящем документе,

определяют количество молей глюкозы, обнаруженных в ферментированном молоке после ферментации, минус количество молей глюкозы, которая может уже присутствовать в молоке до ферментации (если есть) (накопленная глюкоза). Затем рассчитывают отношение накопленной глюкозы к потребленной лактозе, и оно представляет собой % глюкозной составляющей потребленной лактозы, которая высвобождается и накапливается в указанном ферментированном молоке. В конкретном варианте осуществления, когда штамм по настоящему изобретению используют для ферментации молока, согласно анализу с помощью теста В, отношение количества накопленной/высвобожденной глюкозы (мМ) в указанном ферментированном молоке к количеству потребленной лактозы указанным штаммом (мМ) составляет более чем 30%. В конкретном варианте осуществления, когда штамм по настоящему изобретению используют для ферментации молока, согласно анализу с помощью теста В, отношение количества накопленной/высвобожденной глюкозы (мМ) в указанном ферментированном молоке к количеству потребленной лактозы указанным штаммом (мМ) составляет более чем 40%. В конкретном варианте осуществления, когда штамм по настоящему изобретению используют для ферментации молока, согласно анализу с помощью теста В, отношение количества накопленной/высвобожденной глюкозы (мМ) в указанном ферментированном молоке к количеству потребленной лактозы указанным штаммом (мМ) составляет более чем 50%. В конкретном варианте осуществления, когда штамм по настоящему изобретению используют для ферментации молока, согласно анализу с помощью теста В, отношение количества накопленной/высвобожденной глюкозы (мМ) в указанном ферментированном молоке к количеству потребленной лактозы указанным штаммом (мМ) составляет более чем 60%. В конкретном варианте осуществления, когда штамм по настоящему изобретению используют для ферментации молока, согласно анализу с помощью теста В, отношение количества накопленной/высвобожденной глюкозы (мМ) в указанном ферментированном молоке к количеству потребленной лактозы указанным штаммом (мМ) выбрано из группы, состоящей из отношения, которое составляет более чем 30%, более чем 40%, более чем 50 и более чем 60%.

2) В конкретном варианте осуществления (отдельно или в комбинации с признаком 1) штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению, несущий мутацию в гене *glcK*, дополнительно характеризуется тем фактом, что концентрация глюкозы в молоке, ферментированном указанным штаммом *Streptococcus thermophilus* согласно анализу с помощью теста В, составляет по меньшей мере 10 мМ. В конкретном варианте осуществления концентрация глюкозы в молоке, ферментированном указанным штаммом *Streptococcus thermophilus*, согласно анализу с помощью теста В, составляет по меньшей мере 15 мМ. В конкретном варианте осуществления концентрация глюкозы в молоке, ферментированном указанным штаммом *Streptococcus thermophilus*, согласно анализу с помощью теста В, составляет по меньшей мере 20 мМ. В конкретном варианте осуществления концентрация глюкозы в молоке, ферментированном указанным штаммом *Streptococcus thermophilus*, согласно анализу с помощью теста В, составляет по меньшей

мере 25 мМ. В конкретном варианте осуществления концентрация глюкозы в молоке, ферментированном указанным штаммом *Streptococcus thermophilus*, согласно анализу с помощью теста В, выбрана из группы, состоящей из концентраций, составляющей, по меньшей мере, 10 мМ, по меньшей мере, 15 мМ, по меньшей мере, 20 мМ и по меньшей мере 25 мМ.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению - имеющий значительно сниженную, но не равную нулю активность глюкокиназы, как определено в настоящем документе, и необязательно имеющий значительно сниженную, но не равную нулю максимальную скорость прямой реакции (V_{max}) его глюкокиназы, как определено в настоящем документе, дополнительно характеризуется 1 из этих признаков или комбинацией этих 2 признаков:

1) когда указанный штамм используют для ферментации молока, согласно анализу с помощью теста В, отношение количества накопленной/высвобожденной глюкозы (мМ) в указанном ферментированном молоке к количеству потребленной лактозы указанным штаммом (мМ) выбирают из группы, состоящей из отношения, которое составляет более чем 30%, 40%, 50 и 60%;

2) когда указанный штамм используют для ферментации молока, согласно анализу с помощью теста В, концентрацию глюкозы в указанном ферментированном молоке выбирают из группы, состоящей из концентрации, составляющей по меньшей мере, 10 мМ, по меньшей мере, 15 мМ, по меньшей мере, 20 мМ, и по меньшей мере 25 мМ;

II. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению, несущий мутацию в своем гене *ссрА*.

Изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, несущему мутацию в гене *ссрА*, где отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме согласно анализу с помощью теста E составляет по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе.

Любая мутация может быть введена в ген *ссрА* штамма *Streptococcus thermophilus* при условии, что получено указанное выше отношение лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, несущего этот мутированный ген *ссрА*.

В одном варианте осуществления мутация гена *ссрА* не является мутацией, приводящей к нокауту (то есть полному нарушению) гена.

В одном варианте осуществления мутация гена *ссрА* представляет собой мутацию в кодирующей последовательности гена *ссрА*, в частности в первых 270 нуклеотидах кодирующей последовательности гена *ссрА*. В одном варианте осуществления мутация представляет собой мутацию, выбранную из группы, состоящей из:

а) несмысловой мутации (то есть ведущая к стоп-кодону), расположенной между нуклеотидом 1 и нуклеотидом 270 кодирующей последовательности гена *ссрА*; и

b) мутации, расположенной в первой четверти кодирующей последовательности гена *ссрА* (то есть между нуклеотидом 1 и нуклеотидом 250), приводящей к сдвигу открытой рамки считывания гена *ссрА*.

В одном варианте осуществления мутация, приводящая к сдвигу открытой рамки считывания гена *ссрА*, расположена между нуклеотидом 50 и нуклеотидом 200 кодирующей последовательности гена *ссрА*. В другом варианте осуществления мутация, приводящая к сдвигу открытой рамки считывания гена *ссрА*, расположена между нуклеотидом 100 и нуклеотидом 150 кодирующей последовательности гена *ссрА*. Независимо от расположения мутации, приводящей к сдвигу рамки, мутация выбирается из группы, состоящей из делеции, вставки или делеции/вставки (которые все не кратны 3).

Хотя два штамма *Streptococcus thermophilus* могут различаться по последовательности их соответствующего гена *ссрА*, это не обязательно означает, что один из этих двух генов *ссрА* мутирован в смысле изобретения. Действительно, в рамках настоящего изобретения в качестве мутаций гена *ссрА* не рассматриваются:

- вариации на уровне нуклеотидов, которые приводят к изменению на уровне белка, но при этом это изменение не позволяет получить отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, в лактозо-положительном, галактозо-отрицательном штамме *Streptococcus thermophilus*, кодирующем этот модифицированный белок, составляющее по меньшей мере 4×10^{-6}

Неограничивающими примерами генов *ссрА*, которые не считаются мутированными в смысле изобретения, являются:

- полинуклеотид, как определено в SEQ ID NO: 65 (*ссрА* тип ST1); этот тип *ссрА* относится к типу штамма DGCC7710;

- полинуклеотид, как определено в SEQ ID NO: 66 (*ссрА* тип ST2), который на 99,8% идентичен с SEQ ID NO: 65;

- полинуклеотид, определенный в SEQ ID NO: 67 (*ссрА* тип ST3), который на 99,8% идентичен с SEQ ID NO: 65;

- полинуклеотид, определенный в SEQ ID NO: 68 (*ссрА* тип ST4), который на 99,7% идентичен с SEQ ID NO: 65;

- полинуклеотид, определенный в SEQ ID NO: 69 (*ссрА* тип ST5), который на 99,8% идентичен с SEQ ID NO: 65; а также

- полинуклеотид, определенный в SEQ ID NO: 70 (*ссрА* тип ST6), который на 99,7% идентичен с SEQ ID NO: 65.

Авторы изобретения идентифицировали по меньшей мере одну мутацию, которая, когда она присутствует в гене *ссрА* лактозо-положительного, галактозо-отрицательного, штамма *Streptococcus thermophilus*, позволяет этому штамму демонстрировать отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляет по меньшей мере, 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе. Таким

образом, изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, несущему мутацию в гене *ссрА*, выбранную из группы, состоящей из несмысловой мутации, расположенной между нуклеотидом 1 и нуклеотидом 270 кодирующей последовательности гена *ссрА*, и мутацию, расположенную в первой четверти кодирующей последовательности гена *ссрА*, приводящую к сдвигу открытой рамки считывания гена *ссрА*, где отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме согласно анализу с помощью теста D к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляет по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе.

В одном варианте осуществления мутация гена *ссрА* представляет собой делецию нуклеотида A в отрезке из 7 нуклеотидов A в положениях 114-120 (что приводит к сдвигу открытой рамки считывания гена *ссрА*). Такой мутированный ген *ссрА* *Streptococcus thermophilus* обозначается в настоящем документе как *ссрАΔ1A114-120*. В одном варианте осуществления последовательность указанного мутантного *срА* гена выбрана из группы, состоящей из:

- а) последовательности, определенной в SEQ ID NO: 71; и
- б) вариантной последовательности *ссрА*, имеющей, по меньшей мере, 90% идентичности с SEQ ID NO: 71. Вариант *ссрА*, как определено в настоящем документе, несет мутацию, как определено выше, т.е. выбран из группы, состоящей из несмысловой мутации, расположенной между нуклеотидом 1 и нуклеотидом 270 кодирующей последовательности гена *ссрА* и мутацию, расположенную в первой четверти кодирующей последовательности *ссрА*, приводящую к сдвигу открытой рамки считывания гена *ссрА*.

Для определения варианта *ссрА*, имеющего по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 71, в настоящем документе рассчитывается идентичность по всей длине 2 последовательностей после оптимального выравнивания [т.е. количество идентичных нуклеотидов в выровненных частях последовательности. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность *ссрА* имеет по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с SEQ ID NO: 71. В одном варианте осуществления вариантная последовательность *ссрА* отличается от SEQ ID NO: 71 1-30 нуклеотидными заменами. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность *ссрА* отличается от SEQ ID NO: 71 1-20 нуклеотидными заменами. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность *ссрА* отличается от SEQ ID NO: 71 1-15 нуклеотидными заменами. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность *ссрА* отличается от SEQ ID NO: 71 1-10 нуклеотидными заменами. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность *ссрА* отличается от SEQ ID NO: 71 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидными заменами. В одном варианте осуществления последовательность гена *ссрА* лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 71, 72, 73, 74, 75 и 76.

Кроме отношения активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляющего по меньшей мере, 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе, лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению, несущий мутированный ген *ссрА*, может дополнительно характеризоваться своей способностью высвобождать глюкозу при использовании для ферментации молока.

Таким образом, лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, несущий мутацию в гене *ссрА*, по изобретению дополнительно характеризуется тем фактом, что концентрация глюкозы в молоке, ферментированном указанным штаммом *Streptococcus thermophilus*, согласно анализу с помощью теста B, составляет по меньшей мере, 8 мМ. В конкретном варианте осуществления концентрация глюкозы в молоке, ферментированном указанным штаммом *Streptococcus thermophilus*, согласно анализу с помощью теста B, составляет по меньшей мере 9 мМ. В конкретном варианте осуществления концентрация глюкозы в молоке, ферментированном указанным штаммом *Streptococcus thermophilus*, согласно анализу с помощью теста B, составляет по меньшей мере 10 мМ. В конкретном варианте осуществления концентрация глюкозы в молоке, ферментированном указанным штаммом *Streptococcus thermophilus*, согласно анализу с помощью теста B, составляет по меньшей мере 12 мМ. В конкретном варианте осуществления концентрацию глюкозы в молоке, ферментированном указанным штаммом *Streptococcus thermophilus*, выбирают из группы, состоящей из концентрации, по меньшей мере, 8 мМ, по меньшей мере, 9 мМ, по меньшей мере, 10 мМ и по меньшей мере 12 мМ.

Специалисту в данной области даны указания в этой части заявки, как получить и идентифицировать мутации гена *ссрА*, отличные от конкретно раскрытых. Основываясь на определенном выше отношении [активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, по отношению к активности глюкокиназы в указанном штамме согласно анализу с помощью теста E] вместе с определенным в настоящем документе референсным штаммом, специалист в данной области техники должен знать, как идентифицировать мутированный ген *ссрА* по изобретению и получение штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению.

Таким образом, специалист в данной области может действовать следующим способом:

- a) предоставить штамм *Streptococcus thermophilus*, ген *ссрА* которого определен в SEQ ID NO: 65, такой как штамм DGCC7710;
- b) провести мутагенез гена *ссрА*, например, путем случайного или направленного мутагенеза, чтобы получить ген *ссрА*, последовательность которого отличается от последовательности гена *ссрА* штамма в a);
- c) вставить ген *ссрА*, полученный в b) вместо гена *ссрА* штамма DGCC7710, чтобы получить производное DGCC7710;

d) определить отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E указанного производного DGCC7710, где отношение, составляющее по меньшей мере 4×10^{-6} , означает, что встроенный ген *ссрА* представляет собой мутированный ген *ссрА* в соответствии с изобретением. В конкретном варианте осуществления мутированный ген *ссрА* считается соответствующим настоящему изобретению, когда отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E указанного производного DGCC7710, составляет по меньшей мере 5×10^{-6} , по меньшей мере 6×10^{-6} , по меньшей мере 7×10^{-6} или по меньшей мере 8×10^{-6} . В одном варианте осуществления указанное отношение составляет менее чем 8×10^{-3} .

Кроме того, специалист в данной области для получения и идентификации мутированного гена *ссрА* в соответствии с изобретением и для получения *Streptococcus thermophilus* по изобретению также может действовать следующим способом:

a) предоставить штамм *Streptococcus thermophilus*, ген *ссрА* которого определен в SEQ ID NO: 65, такой как штамм DGCC7710;

b) провести мутагенез гена *ссрА*, например, путем случайного или направленного мутагенеза, чтобы получить ген *ссрА*, последовательность которого отличается от последовательности гена *ссрА* штамма в a);

c) вставить ген *ссрА*, полученный в b) вместо гена *ссрА* штамма DGCC7710, чтобы получить производное DGCC7710;

d) определить отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E указанного производного DGCC7710, и выбрать производное DGCC7710, характеризующееся отношением, составляющим по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе; и

e) определить с помощью теста В концентрацию глюкозы в молоке, ферментированном указанным производным DGCC7710, выбранным в d), где концентрация глюкозы, составляющая по меньшей мере 8 мМ означает, что вставленный ген *ссрА* представляет собой мутированный ген *ссрА* согласно изобретению. В конкретном варианте осуществления мутированный ген *ссрА* считается соответствующим настоящему изобретению, когда концентрация глюкозы, измеренная на стадии e), составляет, по меньшей мере, 9 мМ, по меньшей мере, 10 мМ или, по меньшей мере, 12 мМ.

Альтернативно, специалист в данной области может действовать следующим способом:

a) предоставить штамм DSM32587 (мутированный в его гене *glcK*), депонированный в DSMZ 15 августа 2017 г.;

b) провести мутагенез гена *ссрА* штамма a), например, путем случайного или направленного мутагенеза, чтобы получить ген *ссрА*, последовательность которого

отличается от последовательности гена *срА* в DSM32587, чтобы получить *срА*-мутированный штамм DSM32587;

с) определить отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E *срА*-мутированного штамма DSM32587, полученного в б), и выбрать *срА*-мутированный штамм DSM32587, демонстрирующий отношение, составляющее по меньшей мере 4×10^{-6} ;

и
d) определить с помощью теста B концентрацию глюкозы в молоке, ферментированном с указанным *срА*-мутированным штаммом DSM32587, выбранным в с), где

d1) концентрация глюкозы, составляющая по меньшей мере 50 мМ означает, что мутированный ген *срА* соответствует изобретению. В одном варианте осуществления мутированный ген *срА* считается соответствующим настоящему изобретению, когда концентрация глюкозы, измеренная на стадии d), составляет, по меньшей мере, 60 мМ, по меньшей мере, 70 мМ или, по меньшей мере, 80 мМ, или

d2) увеличение концентрации глюкозы, полученной с указанным *срА*-мутированным штаммом DSM32587, выбранным на стадии с), составляет по меньшей мере 150% по сравнению с концентрацией глюкозы, полученной с использованием штамма DSM32587, при анализе обеих с помощью теста B, означает, что мутированный ген *срА* соответствует изобретению. В одном варианте осуществления мутированный ген *срА* считается соответствующим настоящему изобретению, когда концентрация глюкозы увеличивается на стадии d) по меньшей мере на 200% или по меньшей мере на 300% относительно концентрации глюкозы в штамме DSM32587.

После идентификации мутированный ген *срА* - как указано в настоящем документе - может быть введен вместо гена *срА* лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, чтобы получить лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению.

III. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению, несущий мутацию в своем гене *glcK* и мутацию в своем гене *срА*.

Изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, содержащему мутацию в гене *glcK*, кодирующую глюкокиназу, активность которой в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю, как определено в настоящем документе, и несущему мутацию в его гене *срА*, где отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляет по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе.

В одном варианте осуществления любая мутация гена *glcK*, приводящая к

глюкокиназе, активность которой в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю, как описано в настоящем документе (в частности, в соответствии с I выше), может использоваться в комбинации с любой мутацией *ссрА*, при условии, что отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляет по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе. Другими словами, изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, несущему мутацию в гене *glcK*, как определено в настоящем документе (в частности, в соответствии с I выше), и дополнительно несущему мутацию в гене *ссрА*.

В одном варианте осуществления любая мутация *ссрА*, приводящая к отношению активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, в лактозо-положительном, галактозо-отрицательном штамме *Streptococcus thermophilus*, несущем этот мутированный ген *ссрА* в частности, в штамме DGCC7710, составляющему по меньшей мере, 4×10^{-6} , как описано в настоящем документе (в частности, в разделе II выше), может использоваться с любой мутацией *glcK*, при условии, что отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляет по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе. Другими словами, изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, несущему мутацию в гене *ссрА*, где отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляет по меньшей мере, 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе (в частности, в соответствии с II выше), и дополнительно несет мутацию в гене *glcK*.

В одном варианте осуществления изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, несущему:

- мутированный ген *glcK*, приводящий к глюкокиназе, активность которой в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю, как определено в лактозо-положительном, галактозо-отрицательном штамме *Streptococcus thermophilus*, как определено в настоящем документе, в частности, в разделе I выше; и

- мутированный ген *ссрА*, приводящий к отношению активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, составляющей по меньшей мере, 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе, в частности, как определено в лактозо-положительном, галактозо-отрицательном штамме *Streptococcus thermophilus* в разделе II выше.

Таким образом, любой из вариантов осуществления, раскрытых выше, для мутированного гена *glcK*, приводящего к глюкокиназе, активность которой в указанном

штамме значительно снижена, но не равна нулю, может быть объединен с любым из вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе, для мутированного гена *ссрА*, приводящего к отношению активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, составляющему по меньшей мере, 4×10^{-6} , при условии, что полученный лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, несущий обе мутации, демонстрирует отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляющее по меньшей мере, 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе.

В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению содержит:

- ген *glcK*, кодирующий глюкокиназу, мутантный в его открытой рамке считывания, в частности, приводящий к аминокислотной замене в белке *GlcK*, где активность глюкокиназы в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю;

- ген *ссрА*, несущий мутацию, выбранную из группы, состоящей из а) несмысловой мутации (то есть ведущей к стоп-кодону), расположенной между нуклеотидом 1 и нуклеотидом 270 кодирующей последовательности гена *ссрА*; и б) мутацию, расположенную в первой четверти кодирующей последовательности гена *ссрА* (то есть между нуклеотидом 1 и нуклеотидом 250), приводящую к сдвигу открытой рамки считывания гена *ссрА*.

В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению содержит:

- мутированный ген *glcK*, кодирующий глюкокиназу, положение 144 которой не является глицином, в частности, представляет собой серин, или положение 275 которой не является глутаминовой кислотой, в частности, представляет собой лизин; и

- ген *ссрА*, несущий мутацию, приводящую к сдвигу рамки открытой рамки считывания гена *ссрА*, расположенную между нуклеотидом 50 и нуклеотидом 200 кодирующей последовательности гена *ссрА*.

В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению содержит:

- мутированный ген *glcK*, кодирующий глюкокиназу, положение 144 которой соответствует серину или положение 275 которой соответствует лизину; и

- ген *ссрА*, несущий мутацию, приводящую к сдвигу открытой рамки считывания гена *ссрА*, расположенную между нуклеотидом 100 и нуклеотидом 150 кодирующей последовательности гена *ссрА*.

В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению содержит:

- мутированный ген *glcK*, кодирующий глюкокиназу, последовательность которой выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 56,

57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 и 64 (в частности, SEQ ID NO: 22 и 45); и

- мутированный ген *ссрА*, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 71, 72, 73, 74, 75 и 76 (в частности, SEQ ID NO: 71).

Кроме отношения активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляющего по меньшей мере, 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе, лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению, несущий мутированный ген *glcK* и мутированный ген *ссрА*, может дополнительно характеризоваться своей способностью высвободить глюкозу при использовании для ферментации молока.

Таким образом, лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, несущий мутацию в гене *glcK* и мутацию в гене *ссрА* по изобретению, дополнительно характеризуется тем фактом, что концентрация глюкозы в молоке, ферментированном с использованием указанного штамма *Streptococcus thermophilus*, согласно анализу с помощью теста B, составляет по меньшей мере 50 мМ. В конкретном варианте осуществления концентрация глюкозы в молоке, ферментированном указанным штаммом *Streptococcus thermophilus*, согласно анализу с помощью теста B, составляет по меньшей мере 60 мМ. В конкретном варианте осуществления концентрация глюкозы в молоке, ферментированном указанным штаммом *Streptococcus thermophilus*, согласно анализу с помощью теста B, составляет по меньшей мере 70 мМ. В конкретном варианте осуществления концентрация глюкозы в молоке, ферментированном указанным штаммом *Streptococcus thermophilus*, согласно анализу с помощью теста B, составляет по меньшей мере 80 мМ. В конкретном варианте осуществления концентрация глюкозы в молоке, ферментированном указанным штаммом *Streptococcus thermophilus*, согласно анализу с помощью теста B, выбрана из группы, состоящей из концентрации, составляющей, по меньшей мере, 50 мМ, по меньшей мере, 60 мМ, по меньшей мере, 70 мМ и по меньшей мере 80 мМ.

Методы, подробно описанные выше, с одной стороны, для получения и идентификации мутированного гена *glcK* в лактозо-позитивном, галактозо-негативном штамме *Streptococcus thermophilus* по изобретению, а с другой стороны, для идентификации мутированного гена *ссрА* в лактозо-положительном, галактозо-отрицательном штамме *Streptococcus thermophilus* по изобретению, аналогично применяются в настоящем документе, для получения лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, несущего мутацию в своем гене *glcK* и в своем гене *ссрА*.

В качестве примера, специалист в данной области может использовать следующий способ для получения и идентификации мутированного гена *ссрА* согласно изобретению:

- а) предоставить штамм DSM32587 (мутированный в его гене *glcK*);
- б) провести мутагенез гена *ссрА* штамма а), например, путем случайного или направленного мутагенеза, чтобы получить ген *ссрА*, последовательность которого

отличается от последовательности гена *срА* в DSM32587, чтобы получить *срА*-мутированный штамм DSM32587;

с) определить отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E *срА*-мутированного штамма DSM32587, полученного в b), и выбрать *срА*-мутированный штамм DSM32587, демонстрирующий отношение, составляющее по меньшей мере 4×10^{-6} ; и

d) определить с помощью теста B концентрацию глюкозы в молоке, ферментированном с указанным *срА*-мутированным штаммом DSM32587, выбранным в с), где

d1) концентрация глюкозы, составляющая по меньшей мере 50 мМ означает, что мутированный ген *срА* соответствует изобретению. В одном варианте осуществления мутированный ген *срА* считается соответствующим настоящему изобретению, когда концентрация глюкозы, измеренная на стадии d), составляет, по меньшей мере, 60 мМ, по меньшей мере, 70 мМ или, по меньшей мере, 80 мМ, или

d2) увеличение концентрации глюкозы, полученной с указанным *срА*-мутированным штаммом DSM32587, выбранным на стадии с), составляет по меньшей мере 150% по сравнению с концентрацией глюкозы, полученной с использованием штамма DSM32587, при анализе обеих с помощью теста B, означает, что мутированный ген *срА* соответствует изобретению. В одном варианте осуществления мутированный ген *срА* считается соответствующим настоящему изобретению, когда концентрация глюкозы увеличивается на стадии d) по меньшей мере на 200% или по меньшей мере на 300% относительно концентрации глюкозы в штамме DSM32587.

В другом примере специалист в данной области может использовать следующий способ для получения и идентификации мутированного гена *glcK* в соответствии с изобретением:

a) предоставить штамм DGCC7710, в котором его ген *срА* был заменен мутированным геном *срА*, как определено в SEQ ID NO: 71 (*срА* Δ 1A114-120), называемый в настоящем документе штаммом DGCC7710-*срА* Δ 1A114-120;

b) провести мутагенез гена *glcK* штамма DGCC7710-*срА* Δ 1A114-120 a), например, путем случайного или направленного мутагенеза, чтобы получить ген *glcK*, последовательность которого отличается от последовательности гена *glcK* DGCC7710-штамм *срА* Δ 1A114-120, чтобы получить *GLCK*-мутированный штамм DGCC7710-*срА* Δ 1A114-120;

с) определить отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к отношению активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E *glcK*-мутированного штамма DGCC7710-*срА* Δ 1A114-120, полученного на стадии b), и выбрать *glcK*-мутированный DGCC7710-*срА* Δ 1A114-120 штамм с отношением, составляющим по меньшей мере 4×10^{-6} ; и

d) определить с помощью теста B концентрации глюкозы в молоке,

ферментированном с помощью указанного *glcK*-мутированного штамма DGCC7710-*срAΔ1A114-120*, выбранного на стадии с), где

d1) концентрация глюкозы, составляющая по меньшей мере 50 мМ означает, что мутированный ген *glcK* соответствует изобретению. В одном варианте осуществления мутантный ген *glcK* считается в соответствующим изобретению, когда концентрация глюкозы, измеренная на стадии d), составляет, по меньшей мере, 60 мМ, по меньшей мере, 70 мМ или, по меньшей мере, 80 мМ, или

d2) увеличение концентрации глюкозы, полученной с использованием указанного *glcK*-мутированного штамма DGCC7710-*срAΔ1A114-120*, выбранного на стадии с), составляет по меньшей мере, 150% по сравнению с концентрацией глюкозы, полученной с использованием штамма DGCC7710-*срAΔ1A114-120*, при анализе обоих тестом В, означает, что мутированный ген *срA* соответствует изобретению. В одном варианте осуществления мутированный ген *срA* считается соответствующим изобретению, когда повышение уровня глюкозы на стадии d) составляет, по меньшей мере, 200% или, по меньшей мере, 300% концентрации глюкозы в штамме DGCC7710-*срAΔ1A114-120*.

В этом контексте штамм DGCC7710-*срAΔ1A114-120* представляет собой штамм DGCC7710, в который его ген *срA* был заменен геном *срA*, как определено в SEQ ID NO: 71.

После идентификации мутированный ген *glcK* и/или мутированный ген *срA* - как определено в настоящем документе - может быть введен вместо гена *glcK* и/или гена *срA* лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, чтобы получить лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению.

IV. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению, несущий мутацию в своем гене *lacZ*.

Изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, содержащему мутацию в гене *lacZ*, кодирующем бета-галактозидазу (гидролизующую лактозу в галактозу и глюкозу), где отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме согласно анализу с помощью теста D активность глюкокиназы в указанном штамме согласно анализу с помощью теста E составляет по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе.

Подходящей является любая мутация, в частности любая мутация, которая повышает гидролизную активность лактозы (то есть активность бета-галактозидазы) указанной бета-галактозидазы по сравнению с соответствующим штаммом, не мутированным в гене *lacZ*. Мутацию *lacZ*-гена можно также идентифицировать путем мутирования гена *lacZ* штамма DGCC7710 с целью получения *lacZ*-мутированного штамма DGCC7710 и сравнения активности бета-галактозидазы *lacZ*-мутированного штамма DGCC7710 с активностью бета-галактозидазы в штамме DGCC7710, в частности, оба штамма были проанализированы тестом D. Таким образом, мутация *lacZ* по изобретению может быть получена и идентифицирована следующим методом:

а) предоставление штамма DGCC7710;

б) проведение мутагенеза гена *lacZ*, чтобы получить ген *lacZ*, последовательность которого отличается от последовательности *lacZ* DGCC7710, чтобы получить *lacZ*-мутированный штамм DGCC7710;

в) определение активности бета-галактозидазы в *lacZ*-мутированном штамме DGCC7710, полученном на стадии б), и независимо от штамма DGCC7710, оба анализировали с помощью теста D, где тот факт, что активность бета-галактозидазы в *lacZ*-мутированном штамме DGCC7710 выше, чем активность бета-галактозидазы в штамме DGCC7710 означает, что ген *lacZ* мутирован в соответствии с изобретением. Под «более высокой активностью бета-галактозидазы» подразумевается, что активность бета-галактозидазы в *lacZ*-мутированном штамме DGCC7710, полученном на стадии б), по меньшей мере, на 150%, по меньшей мере, на 200% или, по меньшей мере, на 300% выше, чем активность бета-галактозидазы в штамме DGCC7710, когда оба анализируются с помощью теста D.

После идентификации мутированный ген *lacZ* согласно изобретению может быть введен вместо гена *lacZ* лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* для конструирования лактозо-положительного, галактозо-негативного штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению.

Таким образом, хотя два штамма *Streptococcus thermophilus* могут различаться по последовательности их соответствующего гена *lacZ*, это необязательно означает, что один из этих двух генов *lacZ* мутирован в смысле изобретения. Действительно, в рамках настоящего изобретения в качестве мутаций не рассматриваются:

- изменения на уровне нуклеотидов, которые приводят к изменению на уровне белка, но при этом это изменение не влияет на активность полученной бета-галактозидазы, как определено в настоящем документе. Действительно, такие изменения могут наблюдаться на уровне гена *lacZ* *Streptococcus thermophilus* по изобретению, не влияя на объем претензий.

Неограничивающими примерами генов *lacZ*, которые не считаются мутированными в смысле изобретения, являются:

- полинуклеотид, кодирующий бета-галактозидазу, как определено в SEQ ID NO: 78 (Beta-Gal типа ST1), в частности, полинуклеотид, как определено в SEQ ID NO: 77; этот тип Beta-Gal относится к типу штамма DGCC7710;

- *lacZ*-полинуклеотид, кодирующий бета-галактозидазу, как определено в SEQ ID NO: 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108 и 110 (Beta-Gal типа ST2-ST13), в частности полинуклеотид *lacZ*, как определено в SEQ ID NO: 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107 и 109. Последовательность бета-галактозидаз, как определено в SEQ ID NO: 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108 и 110, на 98,9-99,9% идентична SEQ ID NO: 78.

В одном варианте осуществления *Streptococcus thermophilus* по изобретению не несет мутации, выбранной из группы, состоящей из мутации, приводящей к нокауту гена

lacZ и крупных делеций в гене lacZ.

В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет мутацию в регуляторной последовательности, в частности, в промоторе гена lacZ, приводящую к сверхэкспрессии транскрипции гена lacZ. Неограничивающие примеры промоторных последовательностей, которые могут быть мутированы в рамках изобретения, раскрыты в нуклеотидах с 1 по 126 генов lacZ, как определено в SEQ ID NO: 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107 и 109.

В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет мутацию в кодирующей последовательности гена lacZ, приводящую к замене аминокислоты в бета-галактозидазе, такую что активность бета-галактозидазы увеличивается, как определено в настоящем документе. В одном варианте осуществления указанная замена не приводит к получению укороченной бета-галактозидазы. Неограничивающие примеры кодирующих последовательностей lacZ, которые могут быть мутированы в рамках изобретения, раскрыты в нуклеотидах 127-3231 генов lacZ, как определено в SEQ ID NO: 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107 и 109.

Специалисту в данной области даны дополнительные указания о том, как получить и идентифицировать мутации гена lacZ. Основываясь на определенном выше отношении [активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме согласно анализу с помощью теста E] вместе с референсным штаммом, определенным в настоящем документе, специалисту в данной области техники должно быть понятно, как идентифицировать мутированный ген lacZ по изобретению и получить *Streptococcus thermophilus* по изобретению.

Таким образом, специалист в данной области может действовать следующим способом:

- a) предоставить штамм *Streptococcus thermophilus*, ген lacZ которого определен в SEQ ID NO: 77, такой как штамм DGCC7710;
- b) провести мутагенез гена lacZ, например, путем случайного или направленного мутагенеза, чтобы получить ген lacZ, последовательность которого отличается от последовательности гена lacZ штамма в a);
- c) вставить ген lacZ, полученный в b) вместо гена lacZ штамма DGCC7710, чтобы получить производное DGCC7710;
- d) определить отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E указанного производного DGCC7710, где отношение, составляющее по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе, означает, что встроенный ген lacZ представляет собой мутированный ген lacZ согласно изобретению. В конкретном варианте осуществления мутированный ген lacZ считается соответствующим настоящему изобретению, когда отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с

помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E указанного производного штамма DGCC7710, составляет по меньшей мере 5×10^{-6} , по меньшей мере 6×10^{-6} , по меньшей мере 7×10^{-6} или по меньшей мере 8×10^{-6} . В одном варианте осуществления указанное отношение составляет менее чем 8×10^{-3} .

В одном варианте осуществления специалист в данной области может действовать следующим способом:

a) предоставить штамм *Streptococcus thermophilus*, промоторная последовательность гена *lacZ* которого определена в нуклеотидах 1-126 SEQ ID NO: 77, такой как штамм DGCC7710;

b) провести мутагенез гена *lacZ*, например, путем случайного или направленного мутагенеза, чтобы получить промоторную последовательность гена *lacZ*, последовательность которой отличается от промоторной последовательности гена *lacZ* штамма в a);

c) вставить ген мутированный промотор гена *lacZ*, полученный в b) вместо промотора гена *lacZ* штамма DGCC7710, чтобы получить производное DGCC7710;

d) определить отношения активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E указанного производного DGCC7710, где отношение, составляющее по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе, означает, что встроенный промотор гена *lacZ* представляет собой мутированный промотор гена *lacZ* по изобретению. В конкретном варианте осуществления мутированный промотор гена *lacZ* считается соответствующим настоящему изобретению, когда отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E указанного штамма производного DGCC7710, составляет по меньшей мере 5×10^{-6} , по меньшей мере, 6×10^{-6} , по меньшей мере, 7×10^{-6} или, по меньшей мере, 8×10^{-6} . В одном варианте осуществления указанное отношение составляет менее чем 8×10^{-3} .

После идентификации мутированный ген *lacZ*, в частности мутированный промотор гена *lacZ*, как определено в настоящем документе, может быть введен вместо гена *lacZ*, в частности, вместо промотора гена *lacZ*, лактозо-положительного галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* для получения лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению.

V. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению, несущий мутацию в своем гене *ptsH*

Изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, несущему мутацию в гене *ptsH*, кодирующем белок HPr, где отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляет по меньшей мере, 4×10^{-6} , как определено в

настоящем документе.

Любая мутация является подходящей до тех пор, пока отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, не составит по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе.

Таким образом, хотя два штамма *Streptococcus thermophilus* могут различаться по последовательности их соответствующих генов, это необязательно означает, что один из этих двух генов ptsH является мутированным в смысле изобретения. Действительно, в рамках настоящего изобретения в качестве мутаций не рассматриваются:

- вариации на уровне нуклеотидов, которые приводят к изменению на уровне белка, но при этом это изменение не влияет на активность получаемого белка HPr. Действительно, такие изменения можно наблюдать на уровне гена ptsH *Streptococcus thermophilus* по изобретению, не влияя на объем защиты.

Неограничивающими примерами генов ptsH, которые не считаются мутированными в смысле изобретения, являются:

- полинуклеотид, кодирующий белок HPr, как определено в SEQ ID NO: 112 (HPr тип ST1), в частности, полинуклеотид, как определено в SEQ ID NO: 111; этот тип HPr относится к штамму DGCC7710;

- полинуклеотид ptsH, кодирующий белок HPr, как определено в SEQ ID NO: 114, 116, 118 и 120 (HPr типа ST2-5), в частности, полинуклеотид, как определено в SEQ ID NO: 113, 115, 117 и 119. Последовательность белков HPr, как определено в SEQ ID NO: 114, 116, 118 и 120, на 96,5-98,8% идентична последовательности SEQ ID NO: 112.

В одном варианте осуществления мутация гена ptsH не является мутацией, приводящей к нокауту (то есть полному нарушению) гена ptsH.

В одном варианте осуществления мутация вводится в кодирующую последовательность гена ptsH.

В одном варианте осуществления мутация представляет собой мутацию в кодирующей последовательности гена ptsH, приводящую к укороченному белку HPr. Независимо от положения укорачивания, мутация, введенная в ген ptsH, представляет собой либо нуклеотидную замену, ведущую к стоп-кодону, либо делецию, вставку или делецию/вставку, приводящую к сдвигу открытой рамки считывания и преждевременному стоп-кодону. В одном варианте осуществления мутация, введенная в ген ptsH, представляет собой нуклеотидную замену, ведущую к стоп-кодону. В одном варианте осуществления мутация, введенная в ген ptsH, представляет собой делецию, вставку или делецию/вставку, приводящую к сдвигу открытой рамки считывания и к преждевременному стоп-кодону.

В одном варианте осуществления мутация представляет собой мутацию в кодирующей последовательности гена ptsH, приводящую к замене аминокислоты другой аминокислотой.

В этой части заявки специалисту в данной области даны дальнейшие указания о

том, как получить и идентифицировать мутации гена ptsH. Основываясь на определенном выше отношении [активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме согласно анализу с помощью теста E] вместе со стандартным штаммом, определенным в настоящем документе, специалисту в данной области техники должно быть понятно, как идентифицировать мутантный ген ptsH согласно изобретению и получить *Streptococcus thermophilus* по изобретению.

Таким образом, специалист в данной области может действовать следующим способом:

a) предоставить штамм *Streptococcus thermophilus*, ген ptsH которого определен в SEQ ID NO: 111, такой как штамм DGCC7710;

b) провести мутагенез гена ptsH, например, путем случайного или направленного мутагенеза, чтобы получить ген ptsH, последовательность которого отличается от последовательности штамма ptsH в a);

c) вставить ген ptsH, полученный на стадии b) вместо гена ptsH штамма DGCC7710, чтобы получить производное DGCC7710; и

d) определить отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E указанного производного DGCC7710, где отношение составляющее по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе, означает, что вставленный ген ptsH представляет собой мутированный ген ptsH согласно изобретению. В конкретном варианте осуществления мутированный ген ptsH считается соответствующим изобретению, когда отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E указанного производного DGCC7710, составляет по меньшей мере 5×10^{-6} , по меньшей мере 6×10^{-6} , по меньшей мере 7×10^{-6} или по меньшей мере 8×10^{-6} . В одном варианте осуществления указанное отношение составляет менее чем 8×10^{-3} .

После идентификации мутированный ген ptsH, как идентифицировано в настоящем документе, может быть введен вместо гена ptsH лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, чтобы получить лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению.

VI. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению в соответствии с любым из вариантов осуществления I-V, дополнительно несущий мутацию в гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-специфической PTS.

В дополнение к любой из описанных выше мутаций, как таковых или комбинированных, авторы изобретения показали, что дополнительные мутации генов в лактозо-положительных, галактозо-отрицательных штаммах *Streptococcus thermophilus* по изобретению значительно повышают уровень высвобождения глюкозы во время

молочной ферментации. Авторы изобретения показали, что введение мутированного гена, кодирующего белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, в частности, мутированного гена *manL*, мутированного гена *manM* или мутированного гена *manN*, в *Streptococcus thermophilus*, как определено в I-V выше, приводит к синергизму в отношении высвобождения глюкозы, то есть концентрация высвобождаемой глюкозы намного больше, чем при добавлении концентрации глюкозы, высвобождаемой с использованием *Streptococcus thermophilus*, как определено в I-V выше, и концентрации глюкозы, высвобождаемой с использованием мутации *Streptococcus thermophilus* только в указанном гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-специфической PTS.

Таким образом, изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, выбранному из группы, состоящей из лактозо-положительного, галактозо-отрицательного, *Streptococcus thermophilus* штамма, определенного в I, лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, как определено в II, лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, как определено в III, лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, как определено в IV, и лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, как определено в V, который дополнительно подвергается мутации в одном или более генах, в частности в одном гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-специфической PTS. В одном из вариантов осуществления ген, кодирующий белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, представляет собой ген *manL*, ген *manM*, ген *manN* или ген *manO*. В одном из вариантов осуществления ген, кодирующий белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, представляет собой ген *manL*, ген *manM*, ген *manN* или ген *manO*. В одном варианте осуществления ген, кодирующий белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, представляет собой ген *manL*, ген *manM* или ген *manN*.

Под «мутированным/ мутацией в одном или более генах, в частности в одном гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-специфической PTS», подразумевается, что лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* несет мутацию в одном, двух или трех генах, выбранных из группы, состоящей из гена *manL*, гена *manM*, гена *manN* и гена *manO*. В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* несет мутацию в одном, двух или трех генах, выбранных из группы, состоящей из гена *manL*, гена *manM* и гена *manN*. В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет мутацию в *manL*. В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет мутацию в *manM*. В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет мутацию в *manN*. В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет мутацию в *manL* и мутацию в *manM*. В

одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет мутацию в *manL* и мутацию в *manM*. В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет мутацию в *manM* и мутацию в *manN*. В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет мутацию в *manL*, мутацию в *manM* и мутацию в *manN*.

В одном варианте осуществления изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, несущему мутацию в гене *glcK*, кодирующем глюкокиназу, активность которой в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю, как определено в настоящем документе, и несущие мутацию в одном или более генах, в частности в одном гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, где отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме согласно анализу с помощью теста D к активности глюкокиназы в указанном штамме согласно анализу с помощью теста E, составляет по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе. В одном варианте осуществления один или более генов, в частности, ген, кодирующий белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, представляет собой ген *manL*, ген *manM* и/или ген *manN*.

В одном варианте осуществления изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, несущему мутацию в гене *csrA*, как определено в настоящем документе, и несущему мутацию в одном или более генах, в частности, в одном гене, кодирующем белок манноза-глюкоза-специфичного PTS, где отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляет по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе. В одном варианте осуществления один или более генов, в частности, ген, кодирующий белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, представляет собой ген *manL*, ген *manM* и/или ген *manN*.

В одном варианте осуществления изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, несущему мутацию в гене *glcK*, кодирующем глюкокиназу, активность которой в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю, как определено в настоящем документе, несущему мутацию в своем гене *csrA*, как определено в настоящем документе, и несущему мутацию в одном или более генах, в частности, в одном гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, где отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме согласно анализу с помощью теста E составляет по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе. В одном варианте осуществления один или более генов, в частности, ген, кодирующий белок маннозо-

глюкозо-специфической PTS, представляет собой ген *manL*, ген *manM* и/или ген *manN*.

В одном варианте осуществления изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, несущему мутацию в гене *lacZ*, как определено в настоящем документе, и несущему мутацию в гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, где отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляет по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе. В одном варианте осуществления один или более генов, в частности, ген, кодирующий белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, представляет собой ген *manL*, ген *manM* и/или ген *manN*.

В одном варианте осуществления изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, несущему мутацию в гене *ptsH*, как определено в настоящем документе, и несущему мутацию в гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, где отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляет по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе. В одном варианте осуществления один или более генов, в частности, ген, кодирующий белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, представляет собой ген *manL*, ген *manM* и/или ген *manN*.

Что касается мутации (мутаций) в гене *glcK*, гене *csrA*, комбинациях гена *glcK* и гена *csrA*, гена *lacZ* или гена *ptsH*, то любой из вариантов осуществления, раскрытых выше в I-V, применяется аналогично к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, дополнительно несущему мутацию в гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-специфической PTS по изобретению, при условии, что полученный лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* приводит к отношению активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляет, по меньшей мере, 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе.

Что касается мутации в гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, то подходит любая мутация, в частности, любая мутация, которая уменьшает или отменяет импорт глюкозы из среды в бактерии. Такая мутация может быть получена и идентифицирована путем введения гена, кодирующего белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, в любой из штаммов по изобретению, описанных выше в I-V, и определения с помощью теста B концентрации глюкозы в молоке, ферментированном указанным штаммом, где увеличение концентрации глюкозы по сравнению со штаммом по изобретению согласно I-V означает, что ген, кодирующий белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, подвергнут мутации в соответствии с изобретением.

В одном из вариантов осуществления мутация гена, кодирующего белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, в частности, гена *manL*, гена *manM* или гена *manN*, представляет собой мутацию, ведущую к нокауту (то есть к полному нарушению) гена.

В одном варианте осуществления мутация гена, кодирующего белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, в частности, гена *manL*, гена *manM* или гена *manN*, представляет собой мутацию промотора гена, в частности мутацию промотор гена, снижающую или ингибирующую транскрипцию гена.

В одном варианте осуществления мутация гена, кодирующего белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, в частности, гена *manL*, гена *manM* или гена *manN*, представляет собой мутацию, введенную в кодирующую последовательность гена, в частности, мутацию, которая ведет к снижению или отмене активности импорта глюкозы у белка, кодируемого мутированным геном, в частности, ведет к снижению или отмене активности импорта глюкозы белка ПABMan, белка ПСMan или белка ПDMan.

В одном варианте осуществления мутация гена, кодирующего белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, в частности, гена *manL*, гена *manM* или гена *manN*, представляет собой мутацию в кодирующей последовательности гена, приводящую к укороченному белку, в частности, к укороченному белку ПABMan, укороченному белку ПСMan или укороченному белку ПDMan, соответственно, в частности, к укороченному белку (например, укороченному белку ПABMan, укороченному белку ПСMan или укороченному белку ПDMan), имеющему сниженную или отмененную активность импорта глюкозы. Независимо от положения укорачивания, мутация, введенная в ген, представляет собой либо нуклеотидную замену, ведущую к стоп-кодону, либо делецию, вставку или делецию/вставку, приводящую к сдвигу открытой рамки считывания и преждевременному стоп-кодону. В одном варианте осуществления мутация, введенная в ген, представляет собой нуклеотидную замену, ведущую к стоп-кодону. В одном варианте осуществления мутация, введенная в ген, представляет собой делецию, вставку или делецию/вставку, приводящую к сдвигу открытой рамки считывания и преждевременному стоп-кодону.

Хотя два штамма *Streptococcus thermophilus* могут различаться по последовательности их соответствующего гена *manM* или *ManN*, это не обязательно означает, что один из этих генов мутирован в смысле изобретения. Действительно, в рамках настоящего изобретения в качестве мутаций гена *manL*, гена *manM* или *ManN* не рассматриваются:

- вариации на уровне нуклеотидов, которые не приводят к каким-либо изменениям на уровне белка (молчащие вариации) и которые не влияют на трансляцию РНК *manL*, *manM* или *ManN*;

- вариации на уровне нуклеотидов, которые приводят к изменению на уровне белка, но при этом это изменение не приводит к снижению или отмене активности импорта глюкозы белка маннозо-глюкозо-специфической PTS; и

- вариации на уровне нуклеотидов, которые приводят к изменению на уровне

белка, но при этом это изменение не позволяет увеличить уровень высвобождения глюкозы при введении в любой из штаммов по изобретению, раскрытых выше в I-V.

Неограничивающими примерами генов *manL*, *manM* и *ManN* (соответственно, кодирующих белок ПАВMan, белок ПСMan и белок ПDMan), которые не считаются мутированными в смысле изобретения, являются:

- полинуклеотид, кодирующий белок ПАВMan, определенные в SEQ ID NO: 122 (ПАВMan тип ST1), в частности, полинуклеотид, определенный в SEQ ID NO: 121; этот тип ПАВMan относится к штамму DGCC7710;

- полинуклеотид *manL*, кодирующий соответственно белок ПАВMan, как определено в SEQ ID NO: 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152 и 154 (ПАВMan тип ST2-ST17), в частности, полинуклеотид, как определено в SEQ ID NO: 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151 и 153. Последовательность белка ПАВMan, определенная в SEQ ID NO: 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152 и 154, на 98,4-99,6% идентична SEQ ID NO: 122.

- полинуклеотид, кодирующий белок ПСMan, как определено в SEQ ID NO: 174 (ПСMan тип ST1), в частности, полинуклеотид, как определено в SEQ ID NO: 173; этот тип ПСMan относится к штамму DGCC7710;

- полинуклеотид *manM*, кодирующий, соответственно, белок ПСMan, как определено в SEQ ID NO: 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198 и 200 (ПСMan тип ST2-ST14), в частности, полинуклеотид, как определено в SEQ ID NO: 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197 и 199. Последовательность белков ПСMan, определенная в SEQ ID NO: 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198 и 200, на 98,5-99,6% идентична последовательности SEQ ID NO: 174.

- полинуклеотид, кодирующий белок ПDMan, как определено в SEQ ID NO: 211 (ПDMan тип ST1), в частности полинуклеотид, как определено в SEQ ID NO: 210; этот тип ПDMan относится к DGCC7710;

- полинуклеотид *manN*, кодирующий, соответственно, белок ПDMan, как определено в SEQ ID NO: 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247 и 249 (ПDMan тип ST2-ST20), в частности, полинуклеотид, как определено в SEQ ID NO: 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246 и 248. Последовательность белков ПDMan, определенная в SEQ ID NO: 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247 и 249, на 97,3-99,6% идентична SEQ ID NO: 210.

Авторы изобретения идентифицировали по меньшей мере одну мутацию в гене *manL*, которая при встраивании в ген человека исходного лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* [мутированного в гене *glcK*, гене *ссрА*, в обоих, гене *glcK* и гене *ссрА*, гене *lacZ* или гене *ptsH*, и имеющего отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E,

составляющее по меньшей мере, 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе, как например, любой из штаммов по изобретению, раскрытых выше в I-V], позволяет увеличить концентрацию глюкозы по сравнению с исходным штаммом при анализе с помощью теста В.

Таким образом, изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, несущему мутацию в гене *glcK*, гене *ссрА*, в обоих, гене *glcK* и гене *ссрА*, гене *lacZ* или гене *ptsH*, и мутацию в гене *manL*, где отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляет по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе. В одном варианте осуществления мутация в гене *manL* приводит к укорачиванию белка ПABMan в положении 305. В одном варианте осуществления мутация в гене *manL* представляет собой замену нуклеотида G на нуклеотид T в положении 916 (ведущем к стоп-кодону в положении 306). Белок ПABMan *Streptococcus thermophilus*, укороченный в положении 305, обозначается в настоящем документе как ПABMan305.

В одном варианте осуществления последовательность указанного белка ПABMan, укороченного в положении 305, выбрана из группы, состоящей из:

- а) последовательности, определенной в SEQ ID NO: 156; и
- б) вариантной последовательности ПABMan, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 156, в частности, длиной 305 аминокислот.

Для определения варианта ПABMan, имеющего по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 156, сходство или идентичность рассчитывают в настоящем документе по всей длине 2 последовательностей после оптимального выравнивания [то есть количества сходных или идентичных аминокислотных остатков в выровненных частях последовательности]. В одном варианте осуществления вариантная последовательность ПABMan имеет по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 156. в одном варианте осуществления вариантная последовательность ПABMan имеет по меньшей мере 95% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 156. В одном варианте осуществления вариантная последовательность ПABMan имеет по меньшей мере 97% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 156. в одном варианте осуществления вариантная последовательность ПABMan имеет по меньшей мере 98% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 156.

В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность ПABMan отличается от SEQ ID NO: 156 заменой от 1 до 30 аминокислот. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность ПABMan отличается от SEQ ID NO: 156 заменой от 1 до 20 аминокислот. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность ПABMan отличается от SEQ ID NO: 156 заменой от 1 до 15 аминокислот. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность ПABMan_{variant} отличается от SEQ ID NO: 156 заменой от 1 до 10 аминокислот. В

конкретном варианте осуществления вариантная последовательность ПABMan отличается от SEQ ID NO: 156 заменами 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот. В одном варианте осуществления последовательность белка ПABMan лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 156-172.

В одном варианте осуществления ген *manL*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, кодирует белок ПABM, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 156 и любой вариантной последовательности ПABMan, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 156, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 157-172). В одном варианте осуществления ген *manL*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, является таким, как определено в SEQ ID NO: 155.

Авторы изобретения идентифицировали по меньшей мере одну мутацию в гене *manM*, которая при вставке в ген *manL* исходного лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* [мутированного в гене *glcK*, гене *ссрА*, в обоих, гене *glcK* и гене *ссрА*, гене *lacZ* или гене *ptsH* и имеющего отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляющее по меньшей мере, 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе, как например, любой из штаммов по изобретению, раскрытых выше в I-V], позволяет увеличить концентрацию глюкозы по сравнению с исходным штаммом, при анализе с помощью теста B.

Таким образом, изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, несущему мутацию в гене *glcK*, гене *ссрА*, в обоих, гене *glcK* и гене *ссрА*, гене *lacZ* или гене *ptsH*, и мутацию в гене *manM*, где отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляет по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе. В одном варианте осуществления мутация в гене *manM* приводит к укорачиванию белка ПСMan в положении 208. В одном варианте осуществления мутация в гене *manM* представляет собой замену нуклеотида G на нуклеотид T в положении 625 (приводя к стоп-кодону в положении 209). Белок ПСMan *Streptococcus thermophilus*, укороченный в положении 208, обозначается в настоящем документе как ПСMan208.

В одном варианте осуществления последовательность указанного белка ПСMan, укороченного в положении 208, выбрана из группы, состоящей из:

- a) последовательности, определенной в SEQ ID NO: 202; и
- b) вариантной последовательности ПСMan, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 202, в частности, длиной 208 аминокислот.

Для определения варианта ПСMan, имеющего по меньшей мере 90% сходства или

идентичности с SEQ ID NO: 202, сходство или идентичность рассчитывают в настоящем документе по всей длине 2 последовательностей после оптимального выравнивания [то есть количества сходных или идентичных аминокислотных остатков в выровненных частях последовательностей]. В одном варианте осуществления вариантная последовательность ПСМан имеет по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 202. В одном варианте осуществления вариантная последовательность ПСМан имеет по меньшей мере 95% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 202. В одном варианте осуществления вариантная последовательность ПСМан имеет по меньшей мере 97% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 202. В одном варианте осуществления вариантная последовательность ПСМан имеет по меньшей мере 98% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 202.

В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность ПСМан отличается от SEQ ID NO: 202 заменой от 1 до 30 аминокислот. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность ПСМан отличается от SEQ ID NO: 202 заменой от 1 до 20 аминокислот. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность ПСМан отличается от SEQ ID NO: 202 заменой от 1 до 15 аминокислот. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность ПСМан отличается от SEQ ID NO: 202 заменой от 1 до 10 аминокислот. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность ПСМан отличается от SEQ ID NO: 202 заменами на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот. В одном варианте осуществления последовательность белка ПСМан лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 202-209.

В одном варианте осуществления ген *manM*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, кодирует белок ПСМан, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 202 и любой вариантной последовательности ПСМан, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 202, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 203-209). В одном варианте осуществления ген *manM*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, является таким, как определено в SEQ ID NO: 201.

Авторы изобретения идентифицировали по меньшей мере одну мутацию в гене *manN*, которая при вставке в ген *manN* исходного лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* [мутированного в гене *glcK*, гене *ссрА*, в обоих, гене *glcK* и гене *ссрА*, гене *lacZ* или гене *ptsH* и имеющего отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляющее, по меньшей мере, 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе, как например любого из штаммов по изобретению, раскрытых выше в I-V], позволяет увеличить концентрацию глюкозы по сравнению с исходным штаммом, при анализе с помощью теста B.

Таким образом, изобретение относится к лактозо-положительному, галактозо-отрицательному штамму *Streptococcus thermophilus*, несущему мутацию в гене *glcK*, гене *ссрА*, в обоих, гене *glcK* и гене *ссрА*, гене *lacZ* или гене *ptsH*, и мутацию в гене *manN*, где отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляет по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе. В одном варианте осуществления мутация в гене *manN* приводит к укорачиванию белка IIDMan в положении 28. В одном варианте осуществления мутация в гене *manN* представляет собой вставку нуклеотида A в участок из 5 нуклеотидов A в положениях 37-41 (приводящий к участку из 6 нуклеотидов A, сдвигу рамки и укорачиванию белка IIDMan в положении 28). Этот белок IIDMan *Streptococcus thermophilus*, укороченный в положении 28, обозначается в настоящем документе как IIDMan28.

В одном варианте осуществления последовательность указанного белка IIDMan, укороченного в положении 28, выбрана из группы, состоящей из:

- а) последовательности, определенной в SEQ ID NO: 251; и
- б) вариантной последовательности IIDMan, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 251, в частности, длиной 28 аминокислот.

Для определения варианта IIDMan, имеющего по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 251, сходство или идентичность рассчитывают в настоящем документе по всей длине 2 последовательностей после оптимального выравнивания [то есть количество сходных или идентичных аминокислотных остатков в выровненных частях последовательностей]. В одном варианте осуществления вариантная последовательность IIDMan имеет по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 251. В одном варианте осуществления вариантная последовательность IIDMan имеет по меньшей мере 95% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 251. В одном варианте осуществления вариантная последовательность IIDMan имеет по меньшей мере 96% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 251. В одном варианте осуществления вариантная последовательность IIDMan имеет по меньшей мере 97% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 251.

В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность IIDMan отличается от SEQ ID NO: 251 заменой от 1 до 10 аминокислот. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность IIDMan отличается от SEQ ID NO: 251 на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен. В одном варианте осуществления последовательность белка IIDMan лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 251-255.

В одном варианте осуществления ген *manN*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, кодирует белок IIDMan, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 251 и любой вариантной

последовательности PDMan, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 251, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 252-255). В одном варианте осуществления ген *manN*, переносимый штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению, выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 250.

Кроме отношения активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, по сравнению с активностью глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляющего по меньшей мере, 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе, лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению, дополнительно мутированный в гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-специфической PTS (определенный в разделе VI в настоящем документе), может дополнительно характеризоваться своей способностью высвободить глюкозу при использовании для ферментации молока.

Таким образом, лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, дополнительно мутированный в гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-специфической PTS (определенный в разделе VI в настоящем документе), дополнительно характеризуется тем фактом, что концентрация глюкозы в молоке, ферментированном указанным штаммом *Streptococcus thermophilus*, согласно анализу с помощью теста B, составляет по меньшей мере 80 мМ. В конкретном варианте осуществления концентрация глюкозы в молоке, ферментированном указанным штаммом *Streptococcus thermophilus*, согласно анализу с помощью теста B, составляет по меньшей мере 90 мМ. В конкретном варианте осуществления концентрация глюкозы в молоке, ферментированном указанным штаммом *Streptococcus thermophilus*, согласно анализу с помощью теста B, составляет по меньшей мере 100 мМ. В конкретном варианте осуществления концентрация глюкозы в молоке, ферментированном указанным штаммом *Streptococcus thermophilus*, согласно анализу с помощью теста B, выбрана из группы, состоящей из концентрации, составляющей по меньшей мере 80 мМ, по меньшей мере 90 мМ и по меньшей мере 100 мМ.

Любой метод может быть использован для идентификации мутации в гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, в частности в гене *manL*, гене *manM* или гене *manN*, подходящем для лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению.

В качестве примера, чтобы получить и идентифицировать подходящую мутацию в гене *manL*, гене *manM* или гене *manN*, специалист в данной области может действовать следующим способом:

- а) предоставить штамм DSM32587 (мутированный в его гене *glcK*)
- б) провести мутагенез гена *manL*, *manM* или *manN* штамма а), например, путем случайного или направленного мутагенеза, чтобы получить ген *manL*, *manM* или *manN*, последовательность которого отличается от последовательности гена *manL*, *manM* или *manN* из DSM32587, для получения *man*-мутированного штамма DSM32587;

с) определить отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E мутировавшего штамма DSM32587, полученного на стадии b), и выбрать ман-мутированный штамм DSM32587, имеющий отношение по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе; и

d) определить с помощью теста B концентрацию глюкозы в молоке, ферментированном указанным мутированным штаммом DSM32587, выбранным в с), где

d1) концентрация глюкозы по меньшей мере 80 мМ означает, что мутированный ген *manL*, *manM* или *manN* соответствует изобретению. В одном варианте осуществления мутированный ген *manL*, *manM* или *manN* считается соответствующим настоящему изобретению, когда концентрация глюкозы, измеренная на стадии d), составляет, по меньшей мере, 90 мМ или, по меньшей мере, 100 мМ, или

d2) увеличение концентрации глюкозы, полученной с использованием мутированного штамма DSM32587, выбранного на стадии с), по сравнению со штаммом DSM32587, означает, что мутированный ген *manL*, *manM* или *manN* соответствует изобретению.

Альтернативно, специалист в данной области может действовать следующим способом:

a) предоставить штамм DGCC7710, в котором его ген *ссрА* был заменен мутированным геном *ссрА*, как определено в SEQ ID NO: 71 (*ссрА* Δ 1A114-120), называемый в настоящем документе штаммом DGCC7710-*ссрА* Δ 1A114-120;

b) провести мутагенез гена *manL*, *manM* или *manN* штамма стадии a), например, путем случайного или направленного мутагенеза, чтобы получить ген *manL*, *manM* или *manN*, последовательность которого отличается от последовательности гена *manL*, *manM* или *manN* штамма DGCC7710-*ссрА* Δ 1A114-120 для получения ман-мутированного штамма DGCC7710-*ссрА* Δ 1A114-120;

с) определить отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, по отношению к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, мутированного штамма DGCC7710-*ссрА* Δ 1A114-120, полученного на стадии b), и выбрать ман-мутированный штамм DGCC7710-*ссрА* Δ 1A114-120, демонстрирующий отношение, составляющее по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе; и

d) определить с помощью теста B концентрацию глюкозы в молоке, ферментированном с использованием указанного ман-мутированного штамма DGCC7710-*ссрА* Δ 1A114-120, выбранного в с), где

d1) концентрация глюкозы по меньшей мере 80 мМ означает, что мутированный ген *manL*, *manM* или *manN* соответствует изобретению. в одном варианте осуществления мутированный ген *manL*, *manM* или *manN* считается соответствующим настоящему изобретению, когда концентрация глюкозы, измеренная на стадии d), составляет, по меньшей мере, 90 мМ или, по меньшей мере, 100 мМ; или

d2) увеличение концентрации глюкозы, полученной с использованием мутированного штамма DGCC7710-срAΔ1A114-120, выбранного в с), по сравнению со штаммом DGCC7710-срAΔ1A114-120, означает, что мутированный ген *manL*, *manM* или *manN* соответствует настоящему изобретению.

В вышеупомянутом способе выражение «увеличение концентрации глюкозы» по сравнению с эталонным [исходным] штаммом на стадии d) означает концентрацию глюкозы в тестируемом штамме, которая составляет по меньшей мере 150%, по меньшей мере 200%, по меньшей мере, 300%, по меньшей мере, 400% или, по меньшей мере, 500% концентрации глюкозы эталонного [исходного] штамма, когда оба штамма анализируются с помощью теста В.

В одном варианте осуществления выражение «повышение концентрации глюкозы» по сравнению со штаммом DSM32587 на стадии d) означает концентрацию глюкозы в тестируемом штамме [мутированном в гене *manL*, *manM* или *manN*], которая составляет по меньшей мере 150%, по меньшей мере 200% или по меньшей мере 300% концентрации глюкозы в штамме DSM32587, когда оба штамма анализируют с помощью теста В.

В одном варианте осуществления выражение «увеличение концентрации глюкозы» по сравнению с производным DGCC7710-срAΔ1A114-120 на стадии d) означает концентрацию глюкозы в тестируемом штамме [мутированном в гене *manL*, *manM* или *manN*], которая составляет по меньшей мере 150%, по меньшей мере, 200%, по меньшей мере, 300%, по меньшей мере, 400% или, по меньшей мере, 500% концентрации глюкозы производного DGCC7710-срAΔ1A114-120, когда оба штамма анализируют с помощью теста В.

После идентификации мутированный ген *manL*, *manM* или *manN* согласно изобретению может быть введен вместо *manL*, *manM* или *manN* лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, определенного в I, II, III, IV или V выше.

Примеры некоторых штаммов по изобретению

Изобретение относится к штамму DSM32587 *Streptococcus thermophilus*, депонированному в DSMZ 15 августа 2017 г., или любому его варианту. Было показано, что штамм DSM32587, несущий ген *glcK*, как определено в SEQ ID NO: 21 (кодирующий глюкокиназу, как определено в SEQ ID NO: 22), обладает активностью глюкокиназы в указанном штамме 907 Ед/г общего белкового экстракта, V_{max} в указанном штамме 914 Ед/г общего белкового экстракта при высвобождении в ферментированном молоке 29 мМ глюкозы (согласно анализу, соответственно, с помощью теста А, теста С и теста В).

Вариант штамма DSM32587 определяется в настоящем документе как лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, полученный из штамма DSM32587 и несущий тот же ген *glcK* (SEQ ID NO: 21), что и штамм DSM32587, и где активность глюкокиназы в указанном штамме удовлетворяет признаку «значительно сниженной, но не равной нулю» активности глюкокиназы, как определено в настоящем документе, и удовлетворяет признаку «значительно сниженной, но не равной

нулю» V_{\max} глюкокиназы, как определено в настоящем документе.

В одном варианте осуществления вариант штамма DSM32587 демонстрирует отношение активности бета-галактозидазы, которое анализируют с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, минимальное значение которого выбрано из группы, состоящей из по меньшей мере, 4×10^{-6} , по меньшей мере, 5×10^{-6} , по меньшей мере, 6×10^{-6} , по меньшей мере, 7×10^{-6} и, по меньшей мере, 8×10^{-6} , и, необязательно, максимальное значение отношения составляет меньше, чем 8×10^{-3} .

В конкретном варианте осуществления вариант штамма DSM32587 экспрессирует белок GlcK, как определено в SEQ ID NO: 22, активность глюкокиназы которого в указанном варианте составляет от 800 до 1000 Ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста A, и V_{\max} глюкокиназы в указанном варианте составляет от 800 до 1000 Ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста C.

В конкретном варианте осуществления вариант DSM32587 по изобретению дополнительно характеризуется тем фактом, что концентрация глюкозы в молоке, ферментированном с использованием указанного варианта, согласно анализу с помощью теста B, составляет по меньшей мере 20 мМ. В конкретном варианте осуществления вариант DSM32587 по изобретению характеризуется тем фактом, что концентрация глюкозы в молоке, ферментированном с использованием указанного варианта, согласно анализу с помощью теста B, представляет собой, по меньшей мере, концентрацию глюкозы в молоке, ферментированном штаммом DSM32587, согласно анализу с помощью теста B.

Неограничивающими примерами вариантов являются, например, варианты CRISPR, т.е. варианты штамма DSM32587, имеющие один или более локусов CRISPR, модифицированных путем вставки и/или делеции одного или более спейсеров (по сравнению с локусом (локусами) CRISPR штамма DSM32587).

Изобретение также относится к следующим лактозо-положительным, галактозо-отрицательным штаммам *Streptococcus thermophilus*:

- штамм, соответствующий штамму DSM32587, в котором кодирующая последовательность гена *ссрА* заменена последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 71 (*ссрА*Δ1A114-120), и ее вариантами; вариант определяется в настоящем документе как лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, несущий тот же мутированный ген *ссрА* и демонстрирующий отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, минимальное значение которого выбрано из группы, состоящей из, по меньшей мере, 4×10^{-6} , по меньшей мере, 5×10^{-6} , по меньшей мере, 6×10^{-6} , по меньшей мере, 7×10^{-6} и, по меньшей мере, 8×10^{-6} , и, необязательно, максимальное значение отношения составляет менее чем 8×10^{-3} ;

- штамм, соответствующий штамму DSM32587, в котором кодирующая последовательность гена *manL* заменена последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 155 (кодирующая ПABMan305STOP), и ее вариантами; вариант определен в

настоящем документе как лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, несущий тот же мутированный ген *manL* и демонстрирующий отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, минимальное значение которого выбрано из группы, состоящей из, по меньшей мере, 4×10^{-6} , по меньшей мере, 5×10^{-6} , по меньшей мере, 6×10^{-6} , по меньшей мере, 7×10^{-6} и, по меньшей мере, 8×10^{-6} , и, необязательно, максимальное значение отношения составляет менее чем 8×10^{-3} ;

- штамм, соответствующий штамму DSM32587, в котором кодирующая последовательность гена *manM* заменена последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 201 (кодирующая ПСMan208), и ее вариантами; вариант определен в настоящем документе как лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, несущий тот же мутированный ген *manM* и демонстрирующий отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, минимальное значение которого выбрано из группы, состоящей из, по меньшей мере, 4×10^{-6} , по меньшей мере, 5×10^{-6} , по меньшей мере, 6×10^{-6} , по меньшей мере, 7×10^{-6} и, по меньшей мере, 8×10^{-6} , и, необязательно, максимальное значение отношения составляет менее чем 8×10^{-3} ;

- штамм, соответствующий штамму DSM32587, в котором кодирующая последовательность гена *manN* заменена последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 250 (кодирующая IIDMan28), и ее вариантами; вариант определен в настоящем документе как лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, несущий тот же мутированный ген *manN* и демонстрирующий отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, минимальное значение которого выбрано из группы, состоящей из, по меньшей мере, 4×10^{-6} , по меньшей мере, 5×10^{-6} , по меньшей мере, 6×10^{-6} , по меньшей мере, 7×10^{-6} и, по меньшей мере, 8×10^{-6} , и, необязательно, максимальное значение отношения составляет менее чем 8×10^{-3} ;

- штамм, соответствующий штамму DSM32587, в котором кодирующая последовательность гена *ссрА* заменена последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 71 (*ссрАΔ1A114-120*), и кодирующая последовательность гена *manL* заменена последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 155 (кодирующей ПABMan305STOP), и ее вариантами; вариант определен в настоящем документе как лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, имеющий тот же мутированный ген *ссрА* и тот же мутированный ген *manL*, и демонстрирующий отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, где минимальное значение отношения выбрано из группы, состоящей из, по меньшей мере 4×10^{-6} , по меньшей мере 5×10^{-6} , по меньшей мере 6×10^{-6} , по меньшей мере 7×10^{-6} и по меньшей мере 8×10^{-6} , и, необязательно, максимальное значение отношения составляет меньше чем 8×10^{-3} ;

- штамм, соответствующий штамму DSM32587, в котором кодирующая последовательность гена *ссрА* заменена последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 71 (*ссрА*Δ1A114-120), и кодирующая последовательность гена *manM* заменена последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 201 (кодирующая *ICMan208*) и ее вариантами; вариант определен в настоящем документе как лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, имеющий тот же мутированный ген *ссрА* и тот же мутированный ген *manM*, и демонстрирующий отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, где минимальное значение отношения выбрано из группы, состоящей из по меньшей мере 4×10^{-6} , по меньшей мере 5×10^{-6} , по меньшей мере 6×10^{-6} , по меньшей мере 7×10^{-6} и по меньшей мере 8×10^{-6} , и, необязательно, максимальное значение отношения составляет меньше чем 8×10^{-3} ;

- штамм, соответствующий штамму DSM32587, в который кодирующая последовательность гена *ссрА* заменена последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 71 (*ссрА*Δ1A114-120), и кодирующая последовательность гена *manN* заменена последовательностью в виде представленной в SEQ ID NO: 250 (кодирующая *IDMan28*) и его вариантах; вариант определен в настоящем документе как лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, имеющий тот же мутированный ген *ссрА* и тот же мутированный ген *manN*, и демонстрирующий отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, где минимальное значение отношения выбрано из группы, состоящей из по меньшей мере 4×10^{-6} , по меньшей мере 5×10^{-6} , по меньшей мере 6×10^{-6} , по меньшей мере 7×10^{-6} и по меньшей мере 8×10^{-6} , и, необязательно, максимальное значение отношения составляет меньше чем 8×10^{-3} ;

- штамм, соответствующий штамму DSM28255, в котором кодирующая последовательность гена *ссрА* заменена последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 71 (*ссрА*Δ1A114-120) и ее вариантами; вариант определен в настоящем документе как лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, имеющий тот же мутированный ген *ссрА* и демонстрирующий отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, минимальное значение которого выбирают из группы, состоящей из, по меньшей мере, 4×10^{-6} , по меньшей мере, 5×10^{-6} , по меньшей мере, 6×10^{-6} , по меньшей мере, 7×10^{-6} и, по меньшей мере, 8×10^{-6} , и, необязательно, максимальное значение отношения составляет меньше чем $8 \cdot 10^{-3}$.

!!!- штамм, соответствующий штамму DSM28255, в который кодирующая последовательность гена *ссрА* заменена последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 71 (*ссрА*Δ1A114-120), и кодирующая последовательность гена *manL* заменена последовательностью в виде изложенный в SEQ ID NO: 155 (кодирующий

ПАВMan305STOP) и его варианты; вариант определен в настоящем документе как лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, имеющий тот же мутированный ген *ссрА* и тот же мутированный ген *manL*, и демонстрирующий отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, по отношению к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, где минимальное значение отношения выбрано из группы, состоящей из которой составляет по меньшей мере 4×10^{-6} , по меньшей мере 5×10^{-6} , по меньшей мере 6×10^{-6} , по меньшей мере 7×10^{-6} и по меньшей мере 8×10^{-6} , и, необязательно, максимальное значение отношения составляет меньше 8×10^{-3} .

- штамм, соответствующий штамму DSM28255, в котором кодирующая последовательность гена *ссрА* заменена последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 71 (*ссрАΔ1A114-120*), и кодирующая последовательность гена *manM* заменена последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 201 (кодирующей ПСMan208) и ее вариантами; вариант определен в настоящем документе как лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, имеющий тот же мутированный ген *ссрА* и тот же мутированный ген *manM*, и демонстрирующий отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, где минимальное значение отношения выбрано из группы, состоящей из, по меньшей мере, 4×10^{-6} , по меньшей мере, 5×10^{-6} , по меньшей мере, 6×10^{-6} , по меньшей мере, 7×10^{-6} и, по меньшей мере, 8×10^{-6} и, необязательно, максимальное значение отношения составляет менее чем 8×10^{-3} .

- штамм, соответствующий штамму DSM28255, в который кодирующая последовательность гена *ссрА* заменена последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 71 (*ссрАΔ1A114-120*), и кодирующая последовательность гена *manN* заменена последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 250 (кодирующей ПDMan28), и ее вариантами; вариант определен в настоящем документе как лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, имеющий тот же мутированный ген *ссрА* и тот же мутированный ген *manN*, и демонстрирующий отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, где минимальное значение отношения выбрано из группы, состоящей из по меньшей мере 4×10^{-6} , по меньшей мере 5×10^{-6} , по меньшей мере 6×10^{-6} , по меньшей мере 7×10^{-6} и по меньшей мере 8×10^{-6} , и, необязательно, максимальное значение отношения менее чем 8×10^{-3} .

В конкретном варианте осуществления геномная последовательность вариантного штамма, как определено в настоящем документе, имеет, по меньшей мере, 90% идентичности с геномной последовательностью штамма, из которого получен вариант, в частности, по меньшей мере, 90% идентичности, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по

меньшей мере 99,1%, по меньшей мере 99,2%, по меньшей мере 99,3%, по меньшей мере 99,4%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,6%, по меньшей мере 99,7%, по меньшей мере 99,8%, по меньшей мере 99,9%, по меньшей мере 99,92%, по меньшей мере 99,94%, по меньшей мере 99,96%, по меньшей мере 99,98% или по меньшей мере 99,99% идентичности с геномной последовательностью штамма, из которого получен вариант. Идентичность описывается при сравнении двух последовательностей генома по их полной длине (глобальное выравнивание) и может быть рассчитана с использованием любой программы на основе алгоритма Нидлмана-Вунша.

В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению не несет гена *glcK*, кодирующего глюкокиназу, имеющую серин в положении 144 (то есть кодон 144 гена *glcK* не кодирует серин) за исключением лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, выбранного из группы, состоящей из:

а) лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, как определено в III, ген *glcK* которого кодирует глюкокиназу, имеющую серин в положении 144; и

б) лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, как определено в VI, ген *glcK* которого кодирует глюкокиназу, имеющую серин в положении 144

В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению действительно несет ген *glcK*, кодирующий глюкокиназу, имеющую серин в положении 144, за исключением лактозо-положительного, галактозо-отрицательного *Streptococcus thermophilus*, выбранного из группы, состоящей из:

а) лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, ген *csrA* которого мутирован, как определено в III, и ген *glcK*, который кодирует глюкокиназу, имеющую серин в положении 144;

б) лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, ген *manL* которого мутирован, как определено в VI, и ген *glcK* которого кодирует глюкокиназу, имеющую серин в положении 144;

с) лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, ген *manM* которого мутирован, как определено в VI, и ген *glcK* которого кодирует глюкокиназу, имеющую серин в положении 144; и

д) лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, ген *manN* которого мутирован, как определено в VI, и ген *glcK* которого кодирует глюкокиназу, имеющую серин в положении 144

В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению не несет гена *glcK*, кодирующего глюкокиназу, имеющую серин в положении 144, за исключением лактозо-положительного, галактозо-отрицательного *Streptococcus thermophilus*,

выбранного из группы, состоящей из:

а) лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, ген *sprA* которого определен в SEQ ID NO: 71, и ген *glcK* которого кодирует глюкокиназу, имеющую серин в положении 144;

б) лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, ген *manL* которого кодирует α IIABMan, укороченный в положении 305, такой как ген, определенный в SEQ ID NO: 156, и ген *glcK* которого кодирует глюкокиназу, имеющую серин в положении 144;

с) лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, ген *manM* которого кодирует IICMan, укороченный в положении 208, такой как ген, определенный в SEQ ID NO: 202, и ген *glcK* которого кодирует глюкокиназу, имеющую серин в положении 144;

д) лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, ген *manN* которого кодирует IIDMan, укороченный в положении 28, такой как ген, определенный в SEQ ID NO: 251, и ген *glcK* которого кодирует глюкокиназу, имеющую серин в положении 144;

В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению, как определено в пункте I выше, не несет гена *glcK*, кодирующего глюкокиназу, имеющую серин в положении 144.

В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению не содержит гена *glcK*, кодирующего глюкокиназу, имеющую серин в положении 144.

Композиция, способ и применение с использованием лактозо-положительных, галактозо-отрицательных штаммов *Streptococcus thermophilus* по изобретению

Изобретение также относится к бактериальной композиции, содержащей или состоящей из, по меньшей мере, одного, в частности, одного лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению. В конкретном варианте осуществления бактериальная композиция представляет собой чистую культуру, то есть включает или состоит из одного бактериального штамма. В другом варианте осуществления бактериальная композиция представляет собой смешанную культуру, то есть включает или состоит из лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма (штаммов) *Streptococcus thermophilus* по изобретению и по меньшей мере одного другого бактериального штамма. Под «по меньшей мере» (в отношении штамма или бактерии) подразумевается 1 или более и, в частности, 1, 2, 3, 4 или 5 штаммов.

Таким образом, в одном варианте осуществления бактериальная композиция по изобретению включает или состоит из лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма(ов) *Streptococcus thermophilus* по изобретению и по меньшей мере одной молочнокислой бактерии вида, выбранного из группы, состоящей из видов *Lactococcus*,

видов *Streptococcus*, видов *Lactobacillus*, включая *Lactobacillus acidophilus*, видов *Enterococcus*, видов *Pediococcus*, видов *Leuconostoc*, видов *Bifidobacterium* и видов *Oenococcus* или любой их комбинации. Виды *Lactococcus* включают *Lactobacillus acidophilus* и *Lactococcus lactis*, включая *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* и *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Виды *Bifidobacterium* включают *Bifidobacterium animalis*, в частности *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Другие виды молочнокислых бактерий включают *Leuconostoc* sp., *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *Lactobacillus helveticus*.

В одном варианте осуществления бактериальная композиция включает или состоит из лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма(штаммов) *Streptococcus thermophilus* по изобретению и, по меньшей мере, одного штамма *Streptococcus thermophilus*, отличающегося от штамма(штаммов) *S. thermophilus* по изобретению, и/или, по меньшей мере, одного штамма вида *Lactobacillus* и/или любой их комбинации. В конкретном варианте осуществления бактериальная композиция включает или состоит из штамма(штаммов) *Streptococcus thermophilus* по изобретению, одного или более штаммов вида *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и/или одного или более штаммов вида *Lactobacillus helveticus* и/или любой их комбинации и, необязательно, по меньшей мере одного штамма *Streptococcus thermophilus*, отличного от штамма(штаммов) *S. thermophilus* по изобретению. В конкретном варианте осуществления бактериальная композиция содержит или состоит из штамма(штаммов) *Streptococcus thermophilus* по изобретению, по меньшей мере, одного штамма вида *Streptococcus thermophilus*, отличающегося от штамма(штаммов) *S. thermophilus* по изобретению, и штамма вида *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. В другом конкретном варианте осуществления бактериальная композиция включает или состоит из штамма(штаммов) *Streptococcus thermophilus* по изобретению и штамма вида *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

В одном варианте осуществления бактериальная композиция включает или состоит из штамма(штаммов) *Streptococcus thermophilus* по изобретению, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* и/или *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

В конкретном варианте осуществления любой бактериальной композиции, определенной в настоящем документе, в виде чистой или смешанной культуры, бактериальная композиция дополнительно содержит по меньшей мере один пробиотический штамм, такой как *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* или *Lactobacillus casei*.

В конкретном варианте осуществления бактериальная композиция в виде чистой или смешанной культуры, как определено выше, находится в замороженном, высушенном, лиофилизированном, жидком или твердом формате, в форме гранул или замороженных гранул, или в виде порошка или сухого порошка. В конкретном варианте осуществления бактериальная композиция по изобретению находится в замороженном виде или в форме гранул или замороженных гранул, в частности, содержащихся в одной или более коробках или саше. В другом варианте осуществления бактериальная

композиция, как определено в настоящем документе, находится в форме порошка, такого как высушенный или лиофилизированный порошок, в частности, содержащийся в одной или более коробках или саше.

В конкретном варианте осуществления бактериальная композиция по изобретению, либо в виде чистой культуры или смешанной культуры, как определено выше, и любого формата (замороженный, высушенный, лиофилизированный, жидкий или твердый формат) в форме гранул или замороженных гранул или в порошке или сухом порошке) содержит лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм(ы) *Streptococcus thermophilus* по изобретению в концентрации в диапазоне от 10^5 до 10^{12} КОЕ (колониеобразующих единиц) на грамм бактериальной композиции. В конкретном варианте осуществления концентрация лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма(ов) *Streptococcus thermophilus* в бактериальной композиции по изобретению находится в диапазоне от 10^7 до 10^{12} КОЕ на грамм бактериальной композиции и, в частности, по меньшей мере, 10^7 , по меньшей мере, 10^8 , по меньшей мере, 10^9 , по меньшей мере, 10^{10} или, по меньшей мере, 10^{11} КОЕ/г бактериальной композиции. В конкретном варианте осуществления, когда он находится в форме замороженного или сухого концентрата, концентрация лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма(ов) *Streptococcus thermophilus* - в виде чистой культуры или в виде смешанной культуры - в бактериальной композиции находится в диапазоне от 10^8 до 10^{12} КОЕ/г замороженного концентрата или сухого концентрата и более предпочтительно, по меньшей мере, 10^8 , по меньшей мере 10^9 , по меньшей мере 10^{10} , по меньшей мере 10^{11} или по меньшей мере 10^{12} КОЕ/г замороженного концентрата или сухого концентрата.

Изобретение также относится к способу производства ферментированного продукта, включающему а) инокуляцию субстрата лактозо-положительным, галактозо-отрицательным штаммом(штаммами) *Streptococcus thermophilus* по изобретению и б) ферментацию указанного инокулированного субстрата для получения ферментированного продукта. В конкретном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм(штаммы) *Streptococcus thermophilus* по изобретению инокулируют в виде бактериальной композиции, как определено в настоящем документе, такой как чистая культура или смешанная культура. В одном варианте осуществления субстрат, в который добавляют штамм(штаммы) *S. thermophilus* или бактериальную композицию по изобретению, является молочным субстратом. Под «молочным субстратом» подразумевается молоко животного и/или растительного происхождения. В конкретном варианте осуществления молочный субстрат животного происхождения, такой как молоко коров, коз, овец, буйволов, зебр, лошадей, ослов или верблюдов и тому подобное. Молоко может быть в нативном состоянии, восстановленное молоко, обезжиренное молоко или молоко, дополненное соединениями, необходимыми для роста бактерий или для последующей обработки ферментированного молока. Следовательно, в конкретном варианте осуществления изобретение также относится к способу производства

ферментированного молочного продукта, включающему а) инокуляцию молочного субстрата с использованием лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма(ов) *Streptococcus thermophilus* или бактериальной композицией по изобретению и б) ферментацию указанного инокулированного молочного субстрата с получением ферментированного молочного продукта.

Изобретение также относится к использованию лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма(ов) *Streptococcus thermophilus* по изобретению или композиции по изобретению, для производства ферментированного молочного продукта.

Изобретение также относится к ферментированному молочному продукту, который получают с использованием лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма(ов) *Streptococcus thermophilus* по изобретению или бактериальной композиции по изобретению, в частности, полученных или получаемых способом по изобретению. Таким образом, изобретение относится к ферментированному молочному продукту, содержащему лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм(ы) *Streptococcus thermophilus* по изобретению. В конкретном варианте осуществления ферментированный молочный пищевой продукт по изобретению представляет собой свежее ферментированное молоко. В одном варианте осуществления ферментированный молочный продукт по изобретению, в частности свежее ферментированное молоко, как определено в настоящем документе, содержит штамм DSM32587, депонированный в DSMZ 15 августа 2017 года, или любой его вариант, как определено в настоящем документе.

Белки, нуклеиновые кислоты, векторы, конструкции и их применение

Изобретение также относится к глюкокиназе *Streptococcus thermophilus*, активность которой значительно снижена, но не равна нулю в производном DGCC7710. Чтобы проверить, что глюкокиназа по изобретению соответствует признаку «значительно сниженной, но не равной нулю» активности глюкокиназы в производном DGCC7710, ген *glcK* штамма DGCC7710 заменяют геном *glcK*, кодирующим глюкокиназу *Streptococcus thermophilus* по изобретению, который подлежит анализу, для получения производного DGCC7710, и производное DGCC7710 анализируют с помощью теста А (см. пример 4).

Глюкокиназа *Streptococcus thermophilus* удовлетворяет признаку «значительно сниженной, но не равной нулю» активности глюкокиназы в производном DGCC7710, когда

а) либо активность глюкокиназы указанной глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* в производном DGCC7710 составляет от 200 до 1500 Ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста А, в частности от 300 до 1200 Ед/г или от 400 до 1000 Ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста А, или

б) активность указанной глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* в производном DGCC7710 составляет от 5 до 60% активности глюкокиназы штамма DGCC7710, депонированного в DSMZ под номером доступа DSM28255 14 января 2014 г., когда оба анализируются с помощью теста А, в частности от 10 до 50% или от 15 до 40% активности

глюкокиназы штамма DGCC7710, где активность глюкокиназы в указанном производном DG7710 и активность глюкокиназы штамма DGCC7710 анализируют с помощью теста А.

В конкретном варианте осуществления активность глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению в производном DGCC7710 составляет от 200 до 1500 Ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста А. В конкретном варианте осуществления активность глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению в производном DGCC7710 составляет от 300 до 1200 Ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста А. В конкретном варианте осуществления активность глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению в производном DGCC7710 составляет от 400 до 1000 Е/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста А. В конкретном варианте осуществления активность глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению в производном DGCC7710 находится между минимальным значением, выбранным из группы, состоящей из 200, 300 и 400 Ед/г общего белкового экстракта, и максимальным значением, выбранным из группы, состоящей из 1000, 1200 и 1500 Ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста А. Следует отметить, что, как упоминалось в тесте А, значения активности глюкокиназы, раскрытые в настоящем документе, являются средними значениями для трех экспериментов (повторения три раза).

В конкретном варианте осуществления активность глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению в производном DGCC7710 составляет от 5 до 60% активности глюкокиназы штамма DGCC7710, депонированного в DSMZ под номером доступа DSM28255 14 января 2014 года. Под «активностью глюкокиназы штамма DGCC7710» подразумевается активность глюкокиназы штамма DGCC7710 (то есть с SEQ ID NO: 2), согласно анализу с помощью теста А в штамме DGCC7710 [т.е. тест А проводится с использованием штамма DGCC7710]. Процентное значение рассчитывают на основе активности глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению в производном DGCC7710 и активности глюкокиназы штамма DGCC7710, которые анализируют с помощью теста А.

В конкретном варианте осуществления активность глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению в производном DGCC7710 составляет от 5 до 60% активности глюкокиназы штамма DGCC7710. В конкретном варианте осуществления активность глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению в производном DGCC7710 составляет от 10 до 50% активности глюкокиназы штамма DGCC7710. В конкретном варианте осуществления активность глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению в производном DGCC7710 составляет от 15 до 40% активности глюкокиназы штамма DGCC7710. В конкретном варианте осуществления активность глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению в производном DGCC7710 находится между минимальным процентом, выбранным из группы, состоящей из 5, 10 и 15% активности глюкокиназы штамма DGCC7710, и максимальным процентом, выбранным из группы, состоящей из 40, 50 и 60% активности глюкокиназы штамма

DGCC7710. В конкретном варианте осуществления и независимо от диапазона процентных значений активность глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению анализируют в производном DGCC7710 с помощью теста А, как описано в настоящем документе. Следует отметить, что процентные значения, раскрытые в настоящем документе, рассчитываются на основе значений активности глюкокиназы, которые являются средними значениями для трех независимых экспериментов (повторение три раза), согласно анализу с помощью теста А.

Признак «активность глюкокиназы в производном DGCC7710 значительно снижена, но не равна нулю», также может быть охарактеризован в производном DGCC7710 максимальной скоростью прямой реакции глюкокиназы (V_{max}) или аффинностью глюкокиназы (называемой K_m) для одного или двух ее субстратов, т.е. глюкозы и АТФ. В одном варианте осуществления признак «значительно сниженная, но не равная нулю активность глюкокиназы в производном DGCC7710» *Streptococcus thermophilus* по изобретению дополнительно характеризуется максимальной скоростью прямой реакции этой глюкокиназы в производном DGCC7710.

Следовательно, в комбинации с вариантом осуществления признака «активность глюкокиназы в производном DGCC7710 значительно снижена, но не равна нулю», определенного в настоящем документе, максимальная скорость прямой реакции (V_{max}) глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению значительно снижена, но не равна нулю в производном DGCC7710. Чтобы проверить, что глюкокиназа по изобретению удовлетворяет признаку «значительно сниженной, но не равной нулю» V_{max} в производном DGCC7710, открытую рамку считывания гена *glcK* штамма DGCC7710 заменяют открытой рамкой считывания гена *glcK*, кодирующего глюкокиназу *Streptococcus thermophilus* по изобретению, который подлежит анализу, чтобы получить производное DGCC7710, а производное DGCC7710 анализируют с помощью теста С (см. пример 4). Выражение «производное DGCC7710» является таким, как определено выше.

Признак «значительно сниженная, но не равная нулю в производном DGCC7710» V_{max} глюкокиназы по изобретению может быть определен одним или двумя из этих параметров:

- V_{max} глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению в производном DGCC7710 составляет от 200 до 1500 Ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста С;

- V_{max} глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению в производном DGCC7710 составляет от 5 до 60% от V_{max} глюкокиназы штамма DGCC7710, депонированного в DSMZ под номером доступа DSM28255 14 января 2014 г., когда оба анализировали с помощью теста С.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к глюкокиназе *Streptococcus thermophilus* по изобретению, активность которой в производном DGCC7710 значительно снижена, но не равна нулю (как определено в настоящем документе), и где максимальная скорость прямой реакции (V_{max}) указанной глюкокиназы в производном

DGCC7710 значительно снижается, но не равна нулю, и определяется одним или двумя из следующих параметров:

- V_{\max} глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению в производном DGCC7710 составляет от 200 до 1500 Ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста С;

- V_{\max} глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению в производном DGCC7710 составляет от 5 до 60% от V_{\max} глюкокиназы штамма DGCC7710, депонированного в DSMZ под номером доступа DSM28255 14 января 2014 г., когда оба анализировали с помощью теста С.

В конкретном варианте осуществления V_{\max} глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению в производном DGCC7710 составляет от 200 до 1500 Ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста С. В конкретном варианте осуществления V_{\max} глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению в производном DGCC7710 составляет от 300 до 1200 Ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста С. В конкретном варианте осуществления V_{\max} глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению в производном DGCC7710 составляет от 400 до 1000 Ед/г общего белкового экстракта. В конкретном варианте осуществления V_{\max} глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению в производном DGCC7710 находится между минимальным значением, выбранным из группы, состоящей из 200, 300 и 400 Ед/г общего белкового экстракта, и максимальным значением, выбранным из группы, состоящей из 1000, 1200 и 1500 Ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста С.

В конкретном варианте осуществления V_{\max} глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению в производном DGCC7710 составляет от 10 до 50% V_{\max} глюкокиназы штамма DGCC7710, когда оба анализируют с помощью теста С. Подразумевается, что « V_{\max} глюкокиназы штамма DGCC7710» означает V_{\max} глюкокиназы штамма DGCC7710 (то есть с SEQ ID NO: 2), согласно анализу с помощью теста С в штамме DGCC7710 [т.е. тест С проводится с использованием штамма DGCC7710]. Процентное значение рассчитывают на основании V_{\max} глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению в производном DGCC7710 и V_{\max} глюкокиназы штамма DGCC7710, которые анализируют с помощью теста С. В конкретном варианте осуществления V_{\max} глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению в производном DGCC7710 составляет от 15 до 40% V_{\max} глюкокиназы штамма DGCC7710. В конкретном варианте осуществления V_{\max} глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению в производном DGCC7710 находится между минимальным процентом, выбранным из группы, состоящей из 5, 10 и 15% V_{\max} активности глюкокиназы штамма DGCC7710, и максимальным процентом, выбранным из группы, состоящей из 40, 50 и 60% V_{\max} активности глюкокиназы штамма DGCC7710.

В одном варианте осуществления последовательность глюкокиназы штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению, обладающей значительно сниженной, но не

равной нулю активностью глюкокиназы в производном DGCC7710 и необязательно значительно сниженной, но не равной нулю V_{max} в производном DGCC7710, имеет в своем положении 275 (нумерация основана на последовательности как определено в SEQ ID NO: 25) аминокислоту, которая не является глутаминовой кислотой (т.е. является любой аминокислотой, кроме глутаминовой кислоты). В одном варианте осуществления последовательность глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению, обладающей значительно сниженной, но не равной нулю активностью глюкокиназы в производном DGCC7710 и необязательно значительно сниженной, но не равной нулю V_{max} в производном DGCC7710, имеет в своем положении 275 (нумерация основана на последовательности как определена в SEQ ID NO: 25) аминокислоту, которая не является кислой аминокислотой (т.е. является любой аминокислотой, кроме кислой аминокислоты). В одном варианте осуществления последовательность глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению, обладающая значительно сниженной, но не равной нулю активностью глюкокиназы в производном DGCC7710 и необязательно значительно сниженной, но не равной нулю V_{max} в производном DGCC7710, имеет в своем положении 275 (нумерация основана на последовательности как определено в SEQ ID NO: 25) аминокислоту, которая выбрана из группы, состоящей из лизина и любой из его консервативных аминокислот. В одном варианте осуществления последовательность глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению, обладающая значительно сниженной, но не равной нулю активностью глюкокиназы в производном DGCC7710 и необязательно значительно сниженной, но не равной нулю V_{max} в производном DGCC7710, имеет в своем положении 275 (нумерация основана на последовательности, как определено в SEQ ID NO: 25) аминокислоту, которая представляет собой лизин. В конкретном варианте осуществления глюкокиназа *Streptococcus thermophilus* по изобретению имеет длину 322 аминокислоты. В одном варианте осуществления, когда глюкокиназа *Streptococcus thermophilus* имеет в своем положении 275 аминокислоту, которая не является глутаминовой кислотой (в частности, которая не является кислой аминокислотой, в частности, которая представляет собой лизин), глюкокиназа *Streptococcus thermophilus* имеет аргинин в своем положении 278 и/или серин в своем положении 279.

В одном варианте осуществления последовательность глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению, обладающая значительно сниженной, но не равной нулю активностью глюкокиназы в производном DGCC7710 и необязательно значительно сниженной, но не равной нулю V_{max} в производном DGCC7710, имеет в своем положении 144 (нумерация основана на последовательности, как определено в SEQ ID NO: 46) аминокислоту, которая не является глицином (т.е. представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина). В одном варианте осуществления последовательность глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению, обладающая значительно сниженной, но не равной нулю активностью глюкокиназы в производном DGCC7710 и необязательно значительно сниженной, но не равной нулю V_{max} в производном DGCC7710,

имеет в своем положении 144 (нумерация основана на последовательности, как определено в SEQ ID NO: 46) аминокислоту, которая не является алифатической аминокислотой (т.е. является любой аминокислотой, кроме алифатической аминокислоты). В одном варианте осуществления последовательность глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению, обладающая значительно сниженной, но не равной нулю активностью глюкокиназы в производном DGCC7710 и необязательно значительно сниженной, но не равной нулю V_{max} в производном DGCC7710, имеет в своем положении 144 (нумерация основана на последовательности, как определено в SEQ ID NO: 46) аминокислоту, которая выбрана из группы, состоящей из серина и любой из его консервативных аминокислот. В одном варианте осуществления последовательность глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению, обладающая значительно сниженной, но не равной нулю активностью глюкокиназы в производном DGCC7710 и необязательно значительно сниженной, но не равной нулю V_{max} в производном DGCC7710, имеет в своем положении 144 (нумерация основана на последовательности как определено в SEQ ID NO: 46) аминокислоту, которая представляет собой серин. В конкретном варианте осуществления глюкокиназа *Streptococcus thermophilus* по изобретению имеет длину 322 аминокислоты.

В конкретном варианте осуществления последовательность глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению, обладающая значительно сниженной, но не равной нулю активностью глюкокиназы в производном DGCC7710 и необязательно значительно сниженную, но не равную нулю в производном DGCC7710, выбрана из группы, состоящей из:

а) последовательности, как определено в SEQ ID NO: 25, где аминокислота в положении 275 представляет собой любую аминокислоту, кроме глутаминовой кислоты, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме кислой аминокислоты, в частности, представляет собой лизин; и

б) вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 25, где аминокислота глюкокиназы, соответствующая положению 275 SEQ ID NO: 25 (или аминокислота в положении 275 глюкокиназы), представляет собой любую аминокислоту, кроме глутаминовой кислоты, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме кислой аминокислоты, в частности, представляет собой лизин. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK имеет длину 322 аминокислоты. В одном варианте осуществления указанный вариант GlcK имеет аргинин в своем положении 278 и/или серин в своем положении 279.

с) последовательности, как определено в SEQ ID NO: 46, где аминокислота в положении 144 представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме алифатической аминокислоты, в частности, представляет собой серин; и

д) вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства

или идентичности с SEQ ID NO: 46, где аминокислота глюкокиназы, соответствующая положению 144 SEQ ID NO: 46 (или аминокислота в положении 144 глюкокиназы), представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме алифатической аминокислоты, в частности, представляет собой серин. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK имеет длину 322 аминокислоты.

Для определения варианта GlcK, имеющего по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 25, сходство или идентичность рассчитывают в настоящем документе по всей длине 2 последовательностей после оптимального выравнивания [то есть количество сходных или идентичных аминокислотных остатков в выровненных частях последовательностей]; положение 275, как определено в SEQ ID NO: 25, не рассматривается для расчета сходства или идентичности. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK имеет по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 25, где аминокислота глюкокиназы, соответствующая положению 275 SEQ ID NO: 25 (или аминокислота в положении 275 глюкокиназы), представляет собой любую аминокислоту, кроме глутаминовой кислоты, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме кислой аминокислоты, в частности, представляет собой лизин. В одном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK имеет по меньшей мере 95% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 25, где аминокислота, соответствующая положению 275 SEQ ID NO: 25 (или аминокислота в положении 275 глюкокиназы), представляет собой любую аминокислоту, кроме глутаминовой кислоты, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме кислой аминокислоты, в частности, представляет собой лизин. В одном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK имеет по меньшей мере 97% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 25, где аминокислота, соответствующая положению 275 SEQ ID NO: 25 (или аминокислота в положении 275 глюкокиназы), представляет собой любую аминокислоту, кроме глутаминовой кислоты, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме кислой аминокислоты, в частности, представляет собой лизин.

В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK отличается от SEQ ID NO: 25 заменами аминокислот от 1 до 30, где аминокислота в положении 275 указанного варианта GlcK представляет собой любую аминокислоту, кроме глутаминовой кислоты, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме кислой аминокислоты, в частности, представляет собой лизин (положение 275 не учитывается для расчета количества замен). В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK отличается от SEQ ID NO: 25 заменами аминокислот от 1 до 20, где аминокислота в положении 275 указанного варианта GlcK представляет собой любую аминокислоту, кроме глутаминовой кислоты, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме кислой аминокислоты, в частности, представляет собой лизин. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK

отличается от SEQ ID NO: 25 заменами аминокислот от 1 до 15, где аминокислота в положении 275 указанного варианта GlcK представляет собой любую аминокислоту, кроме глутаминовой кислоты, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме кислой аминокислоты, в частности, представляет собой лизин. В конкретном варианте осуществления последовательность GlcK отличается от SEQ ID NO: 25 заменами аминокислот от 1 до 10, где аминокислота в положении 275 указанного варианта GlcK представляет собой любую аминокислоту, кроме глутаминовой кислоты, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме кислой аминокислоты, в частности, представляет собой лизин. В конкретном варианте осуществления последовательность GlcK отличается от SEQ ID NO: 25 на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных замен, где аминокислота в положении 275 указанного варианта GlcK представляет собой любую аминокислоту, за исключением глутаминовой кислоты, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме кислой аминокислоты, в частности, представляет собой лизин.

В конкретном варианте осуществления последовательность глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 и 34, где аминокислота в положение 275 указанного варианта представляет собой любую аминокислоту, кроме глутаминовой кислоты, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме кислой аминокислоты, в частности, представляет собой лизин. В конкретном варианте осуществления либо в виде SEQ ID NO: 25, либо в любой вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 25, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34), аминокислота глюкокиназы по изобретению, соответствующая положению 275 SEQ ID NO: 25 (или аминокислота в положении 275 глюкокиназы по изобретению), не является глутаминовой кислотой.

В конкретном варианте осуществления либо в виде SEQ ID NO: 25, либо в любой вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 25, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34), аминокислота глюкокиназы по изобретению, соответствующая положению 275 SEQ ID NO: 25 (или аминокислота в положении 275 глюкокиназы по изобретению), не является кислой аминокислотой. В конкретном варианте осуществления либо в виде SEQ ID NO: 25, либо в любой вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 25, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34), аминокислота глюкокиназы по изобретению, соответствующая положению 275 SEQ ID NO: 25 (или аминокислота в положении 275 глюкокиназы по изобретению), выбрана из группы состоящий из лизина и любой из его консервативных аминокислот. В конкретном варианте осуществления либо в виде SEQ ID NO: 25, либо в любой вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере

90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 25, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34), аминокислота глюкокиназы по изобретению, соответствующая положению 275 SEQ ID NO: 25 (или аминокислота в положении 275 глюкокиназы по изобретению), представляет собой лизин; таким образом, в конкретном варианте осуществления последовательность глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 и 43.

Для определения варианта GlcK, имеющего по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 46, сходство или идентичность рассчитывают в настоящем документе по всей длине 2 последовательностей после оптимального выравнивания [то есть количество сходных или идентичных аминокислотных остатков в выровненных частях последовательностей]; положение 144, как определено в SEQ ID NO: 46, не учитывается для расчета сходства или идентичности. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK имеет по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 46, где аминокислота глюкокиназы, соответствующая положению 144 SEQ ID NO: 46 (или аминокислота в положении 144 глюкокиназы), представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме алифатической аминокислоты, в частности, представляет собой серин. В одном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK имеет по меньшей мере 95% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 46, где аминокислота, соответствующая положению 144 SEQ ID NO: 46 (или аминокислота в положении 144 глюкокиназы), представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме алифатической аминокислоты, в частности, представляет собой серин. В одном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK имеет по меньшей мере 97% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 46, где аминокислота, соответствующая положению 144 SEQ ID NO: 46 (или аминокислота в положении 144 глюкокиназы), представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме алифатической аминокислоты, в частности, представляет собой серин.

В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK отличается от SEQ ID NO: 46 заменами аминокислот от 1 до 30, где аминокислота в положении 144 указанного варианта GlcK представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме алифатической аминокислоты, в частности, представляет собой серин (положение 144 не учитывается для расчета количества замен). В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK отличается от SEQ ID NO: 46 1-20 аминокислотными заменами, где аминокислота в положении 144 указанного варианта GlcK представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме алифатической аминокислоты, в частности,

представляет собой серин. В конкретном варианте осуществления вариантная последовательность GlcK отличается от SEQ ID NO: 46 1-15 аминокислотными заменами, где аминокислота в положении 144 указанного варианта GlcK представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме алифатической аминокислоты, в частности, представляет собой серин. В конкретном варианте осуществления последовательность GlcK отличается от последовательности SEQ ID NO: 46 1-10 аминокислотными заменами, где аминокислота в положении 144 указанного варианта GlcK представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме алифатической аминокислоты, в частности, представляет собой серин. В конкретном варианте осуществления последовательность GlcK отличается от SEQ ID NO: 46 на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных замен, где аминокислота в положении 144 указанного варианта GlcK представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина, в частности, представляет собой любую аминокислоту, кроме алифатической аминокислоты, в частности, представляет собой серин.

В конкретном варианте осуществления последовательность глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 и 55, где аминокислота в положении 144 указанного варианта представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина, в частности, любую аминокислоту, кроме алифатической аминокислоты, в частности, представляет собой серин. В конкретном варианте осуществления либо в виде SEQ ID NO: 46, либо любой вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 46, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 или 55), аминокислота глюкокиназы по изобретению, соответствующая положению 144 SEQ ID NO: 46 (или аминокислота в положении 144 глюкокиназы по изобретению), не является глицином.

В конкретном варианте осуществления либо в виде SEQ ID NO: 46, либо в любой вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 46, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 или 55), аминокислота глюкокиназы по изобретению, соответствующая положению 144 SEQ ID NO: 46 (или аминокислота в положении 144 глюкокиназы по изобретению), не является алифатической аминокислотой. В конкретном варианте осуществления либо в виде SEQ ID NO: 46, либо в любой вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 46, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 или 55), аминокислота глюкокиназы по изобретению, соответствующая положению 144 SEQ ID NO: 46 (или аминокислота в положении 144 глюкокиназы по изобретению), выбрана из группы состоящий из серина и любой из его консервативных аминокислот. В конкретном варианте осуществления либо в виде SEQ ID NO: 46, либо в любой вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере

90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 46, как определено в настоящем документе (в частности, SEQ ID NO: 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 или 55), аминокислота глюкокиназы по изобретению, соответствующая положению 144 SEQ ID NO: 46 (или аминокислота в положении 144 глюкокиназы по изобретению), представляет собой серин; таким образом, в конкретном варианте осуществления последовательность глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 и 64.

При определении последовательности глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* по изобретению согласно раскрытию настоящей заявки активность глюкокиназы в производном DGCC7710, экспрессирующем эту глюкокиназу, значительно снижена, но не равна нулю, как определено в настоящем документе, и необязательно, что V_{max} этой глюкокиназы в производном DGCC7710 значительно снижена, но не равна нулю, как определено в настоящем документе.

Изобретение также относится к полинуклеотиду, кодирующему глюкокиназу по изобретению, в частности к 322-аминокислотной глюкокиназе по изобретению. В конкретном варианте осуществления указанный полинуклеотид происходит из штамма *Streptococcus thermophilus*. На основе генетического кода специалист в данной области знает, кодирует ли полинуклеотид глюкокиназу *Streptococcus thermophilus* по изобретению. В конкретном варианте осуществления, когда кодируемая глюкокиназа имеет длину 322 аминокислоты, длина полинуклеотида по изобретению составляет 969 нуклеотидов.

Неограничивающий пример полинуклеотида по изобретению раскрыт в SEQ ID NO: 21. Другой неограничивающий пример полинуклеотида по изобретению раскрыт в SEQ ID NO: 44. Другими неограничивающими примерами полинуклеотидов по изобретению являются последовательности, определенные в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 и 19, но в которых кодон 144 или 275 кодирует любую аминокислоту, кроме глицина или глутаминовой кислоты, соответственно, в частности, кодирует любую аминокислоту, кроме алифатической или кислой аминокислоты соответственно, в частности, кодирует серин или лизин, соответственно. В частности, неограничивающими примерами полинуклеотидов по изобретению являются последовательности, определенные в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 и 19, но в которых кодон 275 представляет собой AAA или AAG. В частности, неограничивающими примерами полинуклеотидов по изобретению являются последовательности, определенные в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 и 19, но в которых кодон 144 является AGT AGC, TCT, TCC, TCA или TCG.

Изобретение также относится к применению полинуклеотида по изобретению (или конструкции, плазмиды или вектора) для конструирования бактериальной клетки, в частности грамположительной бактериальной клетки, в частности клетки *Streptococcus thermophilus*. В конкретном варианте осуществления полинуклеотид по изобретению (или конструкция, плазида или вектор) используется для замены гена *glcK* штамма

Streptococcus thermophilus, так что штамм *Streptococcus thermophilus* экспрессирует глюкокиназу по изобретению. В конкретном варианте осуществления единственной глюкокиназой, экспрессируемой указанным полученным *Streptococcus thermophilus*, является глюкокиназа по изобретению. В конкретном варианте осуществления полинуклеотид по изобретению (или конструкция, плаزمид или вектор) используется для замены гена *glcK* лактозо-положительного штамма *Streptococcus thermophilus*. В одном варианте осуществления полинуклеотид по изобретению (или конструкция, плазмид или вектор) используется для замены гена *glcK* лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*.

Изобретение также относится к мутированному гену *ссрА* (или мутированному полинуклеотиду *ссрА*), как определено или идентифицировано выше.

В одном варианте осуществления изобретение относится к (мутированному) полинуклеотиду *ссрА* *Streptococcus thermophilus*, который при вставке вместо гена *ссрА* штамма DGCC7710 [с получением производного DGCC7710], приводит к производному DGCC7710, демонстрирующему отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, составляющее по меньшей мере 4×10^{-6} . В этом контексте производное DGCC7710 представляет собой штамм DGCC7710, в котором исходный ген *ссрА* был заменен на мутированный ген *ссрА*, который будет анализироваться.

В одном варианте осуществления изобретение относится к (мутированному) *ссрА* *Streptococcus thermophilus*, который при вставке вместо гена *ссрА* штамма DSM32587 [с получением производного DSM32587] приводит к производному DSM32587:

- демонстрирующему отношение активности бета-галактозидазы согласно анализу с помощью теста D к активности глюкокиназы согласно анализу с помощью теста E, по меньшей мере, 4×10^{-6} ; и

- высвобождение глюкозы в концентрации, согласно анализу с помощью теста B, которая составляет, по меньшей мере, 50 мМ, или высвобождение глюкозы в концентрации, которая увеличивается, по меньшей мере, на 150% или, по меньшей мере, на 200% по сравнению с концентрацией глюкозы, высвобождаемой штаммом DSM32587, когда оба анализируются с помощью теста B.

В этом контексте производное DSM32587 представляет собой штамм DSM32587, в котором исходный ген *ссрА* был заменен мутированным геном *ссрА*, подлежащим анализу.

В одном варианте осуществления мутированный полинуклеотид *ссрА* не является нокаутным аллелем (то есть нарушенным аллелем) гена *ссрА*.

В одном варианте осуществления мутированный полинуклеотид *ссрА* представляет собой аллель гена *ссрА*, мутированного в кодирующей последовательности. В одном варианте осуществления кодирующая последовательность мутированного полинуклеотида *ссрА* отличается по меньшей мере одной мутацией, в частности одной мутацией, от гена *ссрА*, как определено в SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69 или 70.

В одном варианте осуществления ген *ссрА* несет мутацию, выбранную из группы, состоящей из несмысловой мутации, расположенной между нуклеотидом 1 и нуклеотидом 270 кодирующей последовательности гена *ссрА*, и мутации, расположенной в первой четверти кодирующей последовательности гена *ссрА* (то есть между нуклеотидом 1 и нуклеотидом 250), приводящей к сдвигу открытой рамки считывания гена *ссрА*. В одном варианте осуществления мутация, приводящая к сдвигу открытой рамки считывания гена *ссрА*, расположена между нуклеотидом 50 и нуклеотидом 200 кодирующей последовательности гена *ссрА*. В одном варианте осуществления мутация, приводящая к сдвигу открытой рамки считывания гена *ссрА*, расположена между нуклеотидом 100 и нуклеотидом 150 кодирующей последовательности гена *ссрА*. Независимо от расположения мутации, приводящей к сдвигу рамки, мутация выбирается из группы, состоящей из делеции, вставки или делеции/вставки (которые все не кратны 3). В одном варианте осуществления мутация гена *ссрА* представляет собой делецию нуклеотида А в участке из 7 нуклеотидов А в положениях 114-120.

В одном варианте осуществления последовательность мутированного полинуклеотида *ссрА* выбрана из группы, состоящей из а) последовательности, определенной в SEQ ID NO: 71; и б) вариантной последовательности *ссрА*, имеющей, по меньшей мере, 90% идентичности с SEQ ID NO: 71 (в частности, SEQ ID NO: 72-76). Определение варианта *ссрА*, имеющего по меньшей мере 90% идентичности, подробно описано выше в разделе II.

Изобретение также относится к применению полинуклеотида *glcK*, как определено в настоящем документе, [кодирующего мутированную глюкокиназу *Streptococcus thermophilus*, как определено в настоящем документе], и/или к применению полинуклеотида *ссрА*, как определено в настоящем документе, для конструирования штамма *Streptococcus thermophilus*. Полинуклеотид *glcK* и полинуклеотид *ссрА*, как определено в настоящем документе, считаются мутированными в соответствии с изобретением (то есть, мутированный аллель, как определено в настоящем документе, или идентифицируется способом, описанным в настоящем документе). В одном варианте осуществления используется полинуклеотид *glcK*, как определено в настоящем документе. В одном варианте осуществления используется полинуклеотид *ссрА*, как определено в настоящем документе. В одном варианте осуществления используют как полинуклеотид *glcK*, как определено в настоящем документе, так и полинуклеотид *ссрА*, как определено в настоящем документе.

В одном варианте осуществления применение заключается в замещении (или замене) гена *glcK* и/или гена *ссрА* исходного штамма *Streptococcus thermophilus* на мутированный полинуклеотид *glcK* и/или мутированный полинуклеотид *ссрА*, как определено в настоящем документе, для конструирования штамма *Streptococcus thermophilus*, имеющего замену его исходного гена (генов) (мутированным) геном (генами), как определено в настоящем документе. Изобретение также относится к способу конструирования штамма *Streptococcus thermophilus*, включающему 1) замещение (или

замену) гена *glcK* и/или гена *сррА* исходного штамма *Streptococcus thermophilus* на мутированный полинуклеотид *glcK* и/или мутированный полинуклеотид *сррА*, как определено в настоящем документе, и 2) получение штамма *Streptococcus thermophilus*, у которого его исходный ген (гены) заменен (мутированным) геном (генами), как определено в настоящем документе. В одном из вариантов осуществления применения или способа исходный штамм *Streptococcus thermophilus* представляет собой лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*. В одном из вариантов осуществления применения или способа исходный штамм *Streptococcus thermophilus* представляет собой лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, демонстрирующий отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, составляющее менее чем 4×10^{-6} или менее чем 3×10^{-6} . В одном из вариантов осуществления применения или способа исходный штамм *Streptococcus thermophilus* представляет собой лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, несущий мутированный ген *glcK*, как определено в настоящем документе, или мутированный ген *сррА*, как определено в настоящем документе, и демонстрирующий отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, составляющее более чем 4×10^{-6} .

Изобретение также относится к применению мутированного гена, кодирующего белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, в частности, мутированного гена *manL*, мутированного гена *manM*, мутированного гена *manN* или мутированного *manO*, для конструирования штамма. В одном варианте осуществления изобретение относится к применению мутированного гена, кодирующего белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, в частности, мутированного гена *manL*, мутированного гена *manM* или мутированного гена *manN*, для конструирования штамма. Ген *manL*, ген *manM* или ген *manN*, как определено в настоящем документе, считаются мутированными в соответствии с изобретением (т.е. мутированный аллель, как определено в настоящем документе, или идентифицируется способами, описанными в настоящем документе). В одном варианте осуществления применение заключается в замещении [или замене] гена *manL*, гена *manM* или гена *manN* исходного штамма *Streptococcus thermophilus*, соответственно, на мутированный *manL*, *manM* или полинуклеотид *manN*, как определено в настоящем документе, для конструирования штамма *Streptococcus thermophilus*, имеющего замену своего исходного гена на (мутированный) ген, как определено в настоящем документе. Изобретение также относится к способу конструирования штамма *Streptococcus thermophilus*, включающему 1) замещение [или замену] гена *manL*, гена *manM* или гена *manN* исходного штамма *Streptococcus thermophilus*, соответственно, на мутированный полинуклеотид *manL*, *manM* или *manN*, как определено в настоящем документе, и 2) получение штамма *Streptococcus thermophilus*, в котором его исходный ген заменен (мутированным) геном, как определено в настоящем документе. В одном из вариантов

осуществления применения или способа исходный штамм *Streptococcus thermophilus* представляет собой лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*. Под «соответственно» подразумевается, что исходный *manL* заменяется мутированным *manL*, исходный *manM* заменяется мутированным *manM* и/или исходный *manN* заменяется мутированным *manN*.

В одном из вариантов осуществления применения или способа исходный штамм *Streptococcus thermophilus* представляет собой лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, демонстрирующий отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, по отношению к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, составляющее по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе. В одном варианте осуществления исходный штамм *Streptococcus thermophilus* представляет собой лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, как определено в любом из пунктов I-V выше. Авторы изобретения показали, что введение мутированного гена, кодирующего белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, в частности мутированного гена *manL*, мутированного гена *manM* или мутированного гена *manN* в *Streptococcus thermophilus*, отношение [активности бета-галактозидазы в указанном штамме согласно анализу с помощью теста D к активности глюкокиназы в указанном штамме согласно анализу с помощью теста E] которых составляет по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе, приводит к синергизму в отношении высвобождения глюкозы.

В одном варианте осуществления изобретение относится к применению мутированного гена *Streptococcus thermophilus manL*, гена *manM* или гена *manN*, кодирующего, соответственно, белок ПАВMan, белок ПСMan или белок ПDMan, где активность импорта глюкозы указанного белка снижается или отменяется, чтобы заменить соответствующий ген *manL*, ген *manM* или ген *manN* лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, демонстрирующего отношение активности бета-галактозидазы, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы, согласно анализу с помощью теста E, составляющее по меньшей мере, 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе.

В одном варианте осуществления мутированный ген *manL* *Streptococcus thermophilus*, ген *manM* или ген *manN* характеризуется тем, что при индивидуальной вставке вместо гена *manL* ген *manM* или ген *manN* штамма DSM32587 [дает производное DSM32587], производное DSM32587:

- демонстрирует отношение активности бета-галактозидазы согласно анализу с помощью теста D к активности глюкокиназы согласно анализу с помощью теста E, составляющее по меньшей мере, 4×10^{-6} ; и

- высвобождает глюкозу в концентрации, которая увеличивается, по меньшей мере, на 150% или, по меньшей мере, на 200% по сравнению с концентрацией глюкозы, высвобождаемой штаммом DSM32587, при анализе обоих тестом B.

В этом контексте производное DSM32587 представляет собой штамм DSM32587, в котором исходный ген *manL*, ген *manM* или ген *manN* был заменен мутированным геном *manL*, геном *manM* или геном *manN*, подлежащими анализу.

В одном из вариантов осуществления мутированный ген *manL* *Streptococcus thermophilus*, ген *manM* или ген *manN* характеризуется тем, что при индивидуальной вставке вместо гена *manL*, гена *manM* или гена *manN* штамма DGCC7710-срАΔ1A114-120 (то есть штамма DGCC7710, в котором ген *hercсrA* ранее был заменен геном *срА*, как определено в SEQ ID NO: 71) [с получением производного DGCC7710-срАΔ1A114-120], производное DGCC7710-срАΔ1A114-120:

- демонстрирует отношение активности бета-галактозидазы согласно анализу с помощью теста D к активности глюкокиназы согласно анализу с помощью теста E, составляющее по меньшей мере, 4×10^{-6} ; и

- высвобождает глюкозу в концентрации, которая увеличивается, по меньшей мере, на 150% или, по меньшей мере, на 200% по сравнению с концентрацией глюкозы, высвобождаемой штаммом DGCC7710-срАΔ1A114-120, при анализе обоих с помощью теста B.

В этом контексте штамм DGCC7710-срАΔ1A114-120 представляет собой штамм DGCC7710, в котором его ген *срА* ранее был заменен геном *срА*, как определено в SEQ ID NO: 71. В этом контексте производное DGCC7710-срАΔ1A114-120 представляет собой производное DGCC7710-срАΔ1A114-120, в котором исходный ген *manL*, ген *manM* или ген *manN* был заменен мутированным геном *manL*, геном *manM* или геном *manN*, т.е. штамм DGCC7710, в котором исходный ген *срА* был заменен геном *срА*, как определено в SEQ ID NO: 71, а исходный ген *manL*, ген *manM* или ген *manN* был заменен мутированным геном *manL*, геном *manM* или геном *manN*, подлежащими анализу.

Под «индивидуально вставленным» подразумевается, что для характеристики мутированного гена *man* только один ген *man* штамма DSM32587 или штамма DGCC7710-срАΔ1A114-120 заменяется (или замещается) соответствующим мутированным геном *man*, который должен быть охарактеризован.

В одном варианте осуществления мутированный ген, кодирующий белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, представляет собой мутированный ген *manL*. В одном варианте осуществления мутированный *manL* *Streptococcus thermophilus* кодирует белок ПАВMan *Streptococcus thermophilus*, активность импорта глюкозы которого снижена или отменена, в частности белок ПАВMan *Streptococcus thermophilus*, укороченный в положении 305 (ПАВMan305). В одном варианте осуществления мутированный *manL* *Streptococcus thermophilus* кодирует укороченный белок ПАВMan *Streptococcus thermophilus*, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из а) последовательности, определенной в SEQ ID NO: 156, и б) вариантной последовательности ПАВ, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 156, в частности, длиной 305 аминокислот. В одном варианте осуществления мутированный ген *manL* кодирует белок ПАВMan, последовательность которого выбрана

из группы, состоящей из SEQ ID NO: 156-172. В одном варианте осуществления мутированный ген *manL* *Streptococcus thermophilus* является таким, как определено в SEQ ID NO: 155.

В одном варианте осуществления мутированный ген, кодирующий белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, представляет собой мутированный ген *manM*. В одном варианте осуществления мутированный *Streptococcus thermophilus* *manM* кодирует белок ПСMan *Streptococcus thermophilus*, активность импорта глюкозы которого снижена или отменена, в частности белок ПСMan *Streptococcus thermophilus*, укороченный в положении 208 (ПСMan208). В одном варианте осуществления мутированный *manM* *Streptococcus thermophilus* кодирует укороченный белок ПСMan *Streptococcus thermophilus*, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из а) последовательности, определенной в SEQ ID NO: 202, и б) вариантной последовательности ПСMan, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 202, в частности, длиной 208 аминокислот. В одном варианте осуществления мутированный ген *manM* кодирует белок ПСMan, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 202-209. В одном варианте осуществления мутированный ген *manM* *Streptococcus thermophilus* является таким, как определено в SEQ ID NO: 201.

В одном варианте осуществления мутированный ген, кодирующий белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, представляет собой мутированный ген *manN*. В одном варианте осуществления мутированный *manN* *Streptococcus thermophilus* кодирует белок IIDMan *Streptococcus thermophilus*, активность импорта глюкозы которого снижена или отменена, в частности, белок IIDMan *Streptococcus thermophilus*, укороченный в положении 28 (IIDMan28). В одном варианте осуществления мутированный *manN* *Streptococcus thermophilus* кодирует укороченный белок IIDMan *Streptococcus thermophilus*, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из а) последовательности, определенной в SEQ ID NO: 251; и б) вариантной последовательности IIDMan, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 251, в частности, длиной 28 аминокислот. В одном варианте осуществления мутированный ген *manN* кодирует белок IIDMan, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 251-255. В одном варианте осуществления мутированный ген *manN* *Streptococcus thermophilus* является таким, как определено в SEQ ID NO: 250.

Выражение «вариант ПАВMan, вариант ПСMan и вариант IIDMan, имеющие по меньшей мере 90% сходства или идентичности», определено в части VI выше.

В одном варианте осуществления полинуклеотид, как определено в настоящем документе, представлен в выделенной форме. «Выделенный» полинуклеотид по существу или существенно не содержит компонентов, которые обычно сопровождают или взаимодействуют с геном, обнаруженным в его естественной среде. Таким образом, выделенный полинуклеотид, по существу, не содержит другого клеточного материала или культуральной среды, если он производится рекомбинантными методами, или, по

существу, не содержит химических предшественников или других химических веществ, когда синтезируется химически.

Изобретение также относится к конструкции, содержащей полинуклеотид, как определено в настоящем документе. В одном варианте осуществления настоящее изобретение охватывает конструкцию, содержащую полинуклеотид по изобретению, функционально связанный с регуляторной последовательностью. Термин «функционально связанный» относится к смежному расположению, в котором описанные компоненты находятся вблизи, что позволяет им функционировать нужным образом. Регуляторная последовательность, «функционально связанная» с кодирующей последовательностью, лигируется таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности достигается в условиях, совместимых с контрольными последовательностями. Термин «регуляторные последовательности» включает промоторы и/или энхансеры и другие сигналы регуляции экспрессии. Термин «промотор» используется в обычном смысле уровня техники, например сайт связывания РНК-полимеразы. В одном варианте осуществления, независимо или в комбинации с вариантом осуществления «регуляторной последовательности», конструкция содержит или экспрессирует другой ген, такой как маркер, позволяющий отбор конструкции. Существуют различные маркеры, которые можно использовать, например, такие маркеры, которые обеспечивают устойчивость к антибиотикам, например устойчивость к бактериальным антибиотикам - таким как эритромицин, ампициллин, стрептомицин и тетрациклин.

Таким образом, в дополнительном аспекте предлагается вектор, содержащий полинуклеотид или конструкцию, как определено в настоящем документе. Используемый в настоящем описании термин «вектор» относится к любой молекуле нуклеиновой кислоты, в которую может быть вставлена другая нуклеиновая кислота (например, полинуклеотид по изобретению) и которая может быть введена и реплицирована внутри бактериального штамма, такого как штамм *Streptococcus thermophilus*. Таким образом, термин относится к любой конструкции нуклеиновой кислоты (и, если необходимо, к любой связанной системе доставки), которую можно использовать для введения генетического материала в бактериальный штамм, в частности, штамм *Streptococcus thermophilus*. Выбор подходящих векторов известен специалистам в данной области. В одном варианте осуществления вектор представляет собой плазмиду. Используемый в настоящем описании термин «плазида» относится к кольцевой двухцепочечной (дц) конструкции ДНК, которую можно использовать в качестве вектора для введения ДНК в бактериальный штамм, в частности, штамм *Streptococcus thermophilus*. Конструкции или векторы могут быть введены в бактериальный штамм, как описано в настоящем документе, такой как штамм DGCC7710.

Полинуклеотид, конструкция, вектор или плазида по изобретению, раскрытые в настоящем документе, могут быть введены в штамм *Streptococcus thermophilus* любым доступным способом.

Подразумевается, что термин «введение» (и «введенный») обозначает презентацию штамму *Streptococcus thermophilus* полинуклеотида, конструкции, вектора или плазмиды по изобретению, как определено в настоящем документе, таким образом, что компонент(ы) получает доступ к внутренней части штамма *Streptococcus thermophilus*. Способы и композиции не зависят от конкретного способа введения последовательности в штамм *Streptococcus thermophilus*, только то, что полинуклеотид, конструкция, вектор или плазида по изобретению получают доступ во внутреннюю часть штамма *Streptococcus thermophilus*. Введение включает в себя включение полинуклеотида, конструкции, вектора или плазмиды по настоящему изобретению в штамм *Streptococcus thermophilus*, где полинуклеотид или конструкция по настоящему изобретению могут быть включены в геном *Streptococcus thermophilus* strain, и включает транзиторное (прямое) предоставление полинуклеотида или конструкции для штамма *Streptococcus thermophilus*.

Введение полинуклеотида, конструкции, вектора или плазмиды по изобретению в штамм *Streptococcus thermophilus* может быть осуществлено несколькими способами, включая трансформацию, конъюгацию, трансдукцию или слияние протопласта. Способы введения полинуклеотида, конструкции, вектора или плазмиды по изобретению путем трансформации в штамм *Streptococcus thermophilus* включают, но не ограничиваются ими, микроинъекцию, электропорацию, методы стабильной трансформации, методы транзиторной трансформации [такие как индуцированная компетентность с использованием химических веществ (например, двухвалентных катионов, таких как CaCl₂) или механических (электропорация) средств], ускорение баллистических частиц (бомбардировка частицами), прямой перенос генов, вирус-опосредованное введение, проникающие в клетку пептиды или прямая доставка белка, опосредованная мезопористой кремниевой наночастицей (MSN). Введение полинуклеотида, конструкции, вектора или плазмиды по изобретению в штамм *Streptococcus thermophilus* может быть осуществлено путем конъюгации, которая является специфическим методом естественного обмена ДНК, требующим физического межклеточного контакта. Введение полинуклеотида, конструкции, вектора или плазмиды по изобретению в штамм *Streptococcus thermophilus* может быть осуществлено путем трансдукции, которая представляет собой введение ДНК через вирусную (например, фаговую) инфекцию, которая также является естественным методом обмена ДНК. Обычно такие способы включают в себя включение полинуклеотида внутри молекулы вирусной ДНК или РНК.

Изобретение также относится к следующим мутированным генам *man* как таковым и их соответствующим кодированным белкам:

- мутированный *manL* *Streptococcus thermophilus*, кодирующий укороченный белок ПАВMan *Streptococcus thermophilus*, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из а) последовательности, определенной в SEQ ID NO: 156 и б) вариантной последовательности ПАВ, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 156, в частности, длиной 305 аминокислот. В одном варианте осуществления мутированный ген *manL* *Streptococcus thermophilus* кодирует белок ПАВMan,

последовательность которого выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 156-172. В одном варианте осуществления мутированный ген *manL* *Streptococcus thermophilus* такой, как определен в SEQ ID NO: 155.

- мутированный *manN* *Streptococcus thermophilus*, кодирующий укороченный белок IIDMan *Streptococcus thermophilus*, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из а) последовательности, определенной в SEQ ID NO: 251; и б) вариантной последовательности IIDMan, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 251, в частности, длиной 28 аминокислот. В одном варианте осуществления мутированный ген *manN* *Streptococcus thermophilus* кодирует белок IIDMan, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 251-255. В одном варианте осуществления мутированный ген *manN* *Streptococcus thermophilus* является таким, как определено в SEQ ID NO: 250.

Выражение «вариант IIABMan и вариант IIDMan, имеющие по меньшей мере 90% сходства или идентичности», определено в части VI выше.

Изобретение также относится к способу создания лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, секретирующего глюкозу, включающему:

а) получение лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, который секретирует глюкозу концентрацией менее чем 1 мМ согласно анализу с помощью теста В;

б) мутирование одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из гена *glcK*, гена *scrA*, гена *lacZ* и гена *ptsH*, и необязательно мутирование гена, кодирующего белок маннозо-глюкозо-специфической PTS; и

с) отбор из мутантов, полученных в б) лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, в котором отношение активности бета-галактозидазы согласно анализу с помощью теста D к активности глюкокиназы в указанном штамме согласно анализу с помощью теста E составляет по меньшей мере 4×10^{-6} , как определено в настоящем документе.

В одном варианте осуществления лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, представленный в а), демонстрирует отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляющее менее чем 4×10^{-6} или менее чем 3×10^{-6} , как определено в настоящем документе.

Изобретение также относится к способу создания лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, секретирующего глюкозу, включающему:

а) получение лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, демонстрирующего отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме, согласно анализу с помощью теста D, к активности глюкокиназы в

указанном штамме, согласно анализу с помощью теста E, составляющее по меньшей мере, 4×10^{-6} , как определено, и высвобождение глюкозы в концентрации от 8 до 50 мМ согласно анализу с помощью теста B;

b) мутирование гена, кодирующего белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, в частности гена *manL*, гена *manM* или гена *manN* штамма, представленного в а);

с) отбор из мутантов, полученных в b), лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, где указанный мутант, полученный в b), высвобождает глюкозу в концентрации, по меньшей мере, 60 мМ, согласно анализу с помощью теста B. В одном варианте осуществления, указанный мутант, полученный в b), высвобождает глюкозу в концентрации, по меньшей мере, 70 мМ. В одном варианте осуществления указанный мутант, полученный на стадии b), высвобождает глюкозу в концентрации, по меньшей мере, 80 мМ. В одном варианте осуществления указанный мутант, полученный на стадии b), высвобождает глюкозу в концентрации, по меньшей мере, 90 мМ. В одном варианте осуществления указанный мутант, полученный на стадии b), высвобождает глюкозу в концентрации, по меньшей мере, 100 мМ.

Изобретение также относится к способу выбора лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *S. thermophilus* по изобретению, включающему:

1) предоставление лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, экспрессирующего исходную глюкокиназу, активность которой составляет более чем 1800 ед./г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста A, в частности, более 2000 ед./г общего белкового экстракт согласно анализу с помощью теста A;

2) модификацию открытой рамки считывания гена *glcK* лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* стадии 1) таким образом, чтобы указанный модифицированный штамм *Streptococcus thermophilus* экспрессировал глюкокиназу, последовательность которой модифицирована, как определено в настоящем документе, по сравнению с последовательностью исходной глюкокиназы;

3) оценку с помощью теста A активность глюкокиназы в указанном модифицированном штамме *Streptococcus thermophilus*, полученном на стадии 2);

4) выбор модифицированного штамма *Streptococcus thermophilus*, экспрессирующего глюкокиназу, активность которой в указанном модифицированном штамме снижена, но не равна нулю, как определено в настоящем документе с помощью теста A;

5) необязательно, оценку с помощью теста C V_{max} глюкокиназы в указанном модифицированном штамме *Streptococcus thermophilus*, выбранном на стадии 4), и выбор модифицированного штамма *Streptococcus thermophilus*, экспрессирующего глюкокиназу, V_{max} которой в указанном модифицированном штамме снижена, но не равна нулю, как определено в настоящем документе с помощью теста C.

В одном варианте осуществления стадии 2) модификацию открытой рамки считывания гена *glcK* осуществляют путем направленного мутагенеза гена *glcK* штамма

Streptococcus thermophilus стадии 1). В одном варианте осуществления стадии 2) модификацию открытой рамки считывания гена *glcK* осуществляют путем замены исходной открытой рамки считывания гена *glcK* штамма стадии 1) гетерологичной открытой рамкой считывания гена *glcK* (где «гетерологичный» означает открытую рамку считывания гена *glcK*, который исходно не присутствовал в штамме стадии 1), например открытую рамку считывания гена *glcK*, которая создана синтетическим путем, или открытую рамку считывания гена *glcK*, полученную из другого штамма *Streptococcus thermophilus*).

В одном варианте осуществления стадии 4) признак «активность глюкокиназы в указанном модифицированном штамме значительно снижена, но не равна нулю», определен выше для определения лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению. В конкретном варианте осуществления активность глюкокиназы в модифицированном штамме *Streptococcus thermophilus*, согласно анализу с помощью теста А, составляет от 200 до 1500, от 300 до 1200, от 400 до 1000 Ед/г общего белкового экстракта или находится между минимальным значением, выбранным из группы, состоящей из 200, 300 и 400 ед/г общего белкового экстракта, и максимальным значением, выбранным из группы, состоящей из 1000, 1200 и 1500 ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста А. В конкретном варианте осуществления активность глюкокиназы в модифицированном штамме *Streptococcus thermophilus* составляет от 5 до 60%, от 10 до 50%, от 15 до 40% активности глюкокиназы штамма DGCC7710 (оба проанализированы с помощью теста А) или находится между минимальным процентом, выбранным из группы, состоящей из 5, 10 и 15% активности глюкокиназы штамма DGCC7710, и максимальным процентом, выбранным из группы, состоящей из 40, 50 и 60% активности глюкокиназы штамма DGCC7710 (обе проанализированы с помощью теста А). Выражение «активность глюкокиназы штамма DGCC7710» является таким, как определено выше.

В конкретном варианте осуществления стадии 5) признак « V_{max} глюкокиназы в указанном модифицированном штамме значительно снижена, но не равна нулю» определен выше для определения галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению. В конкретном варианте осуществления максимальная скорость прямой реакции глюкокиназы в модифицированном штамме *Streptococcus thermophilus* составляет от 200 до 1500, от 300 до 1200, от 400 до 1000 ЕД/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста С, или находится между минимальным значением, выбранным из группы, состоящей из 200, 300 и 400 ед/г общего белкового экстракта, и максимальным значением, выбранным из группы, состоящей из 1000, 1200 и 1500 ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста С. В одном варианте осуществления V_{max} глюкокиназы в модифицированном штамме *Streptococcus thermophilus* составляет от 5 до 60%, от 10 до 50%, от 15 до 40%, V_{max} глюкокиназы штамма DGCC7710, когда оба анализируются с помощью теста С, или находится между минимальным процентом, выбранным из группы, состоящей из 5, 10 и

15% V_{max} активности глюкокиназы штамма DGCC7710, и максимальным процентом, выбранным из группы, состоящей из 40, 50 и 60% V_{max} глюкокиназы DGCC7710 str. айн. Выражение « V_{max} глюкокиназы штамма DGCC7710» является таким, как определено выше.

Различные предпочтительные признаки и варианты осуществления настоящего изобретения теперь будут описаны с помощью неограничивающих примеров.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Штаммы и условия роста

Штаммы *S. thermophilus* strains (ST), раскрытые в настоящей заявке, выращивали при 37°C в бульоне M17 (Oxoid, ссылка на поставщик CM0817) с добавлением 30 г/л соответствующего углевода и, если необходимо, добавлением 15 г/л агара бактериологического типа А (Biokar, ссылка поставщика # A1010HA), или при 43°C в молоке (УНТ полуобезжиренное молоко «Le Petit Vendéen» + 3% сухого молока ВВА Lactalis). В автоклавированный бульон M17 добавляли 0,2 мкм-фильтрованную лактозу, сахарозу, галактозу или глюкозу. Замороженный материал штаммов ST получали половинным разбавлением ночной культуры в M17 с добавлением 5 г/л лактозы и 10% глицерина и хранили при -20 °С.

Количественная оценка углеводного катаболизма при ферментации молока [тест В]

Полуобезжиренное молоко УНТ «Le Petit Vendéen» («йогуртовое молоко»), содержащее 3% (масс/об) сухого молока (ВВА, Lactalis), предварительно пастеризованное 10 минут при 90 °С, инокулировали при 1% (об/об, примерно 107 КОЕ/мл) культуры штамма *S. thermophilus*, которую необходимо проанализировать (ресуспендированные клетки без M17-углеводов из ночной культуры, выращенной в M17, с добавлением 3% сахарозы). Было обнаружено, что это молоко содержит примерно 175 мМ лактозы. Инокулированные молочные колбы статически инкубировали на водяной бане при 43°C в течение 24 часов для получения ферментированного молока.

Образцы T0 и образцы ферментированного молока (T24ч) (5 г) разбавляли в 25 г 0,025 N H₂SO₄, затем центрифугировали при 4600 об/мин в течение 10 минут при 4 °С. Супернатант фильтровали через 0,2 мкм нейлоновый фильтр (Phenomenex, Германия, Ашаффенбург) непосредственно во флакон для ВЭЖХ на 2 мл. Образцы хранили при -20°C до дальнейшего анализа. Углеводы определяли количественно с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ Agilent 1200), снабженной детектором показателя преломления, с использованием анионообменной колонки Aminex HPLC-87H (Bio-Rad Laboratories Inc.) при 35 °С, с 12,5 мМ H₂SO₄ в качестве элюирующей жидкости и скорости потока 0,6 мл мин⁻¹. Использование результатов было выполнено с помощью программного обеспечения Chemstation для переработки данных (Agilent).

glcK секвенирование

ПЦР-амплификацию гена глюкокиназы проводили с использованием праймеров GlcK-F4 (5'-CAGGTATGAGTTTAGCAACGG-3') и GlcK-R12 (5'-attcaccacggcctgagac-3'), [стадия инкубации при 98 °С, 5 минут, затем 33 цикла 98 °С, 45 с; 58 °С, 30 с; 68 °С, 3

мин, с конечной стадией удлинения при 72 °С, 7 мин]. Затем продукты ПЦР длиной 2788 п.н. обрабатывали с помощью Illustra™ ExoProStar™ в соответствии с инструкциями производителя (GE Healthcare). Реакции секвенирования проводили с использованием набора циклического секвенирования BigDye® Terminator v3.1 (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя с использованием AB3500 (Applied Biosystems™) и праймеров, перечисленных в Таблице 2.

	Последовательности
GlcK-F4	CAGGTATGAGTTTAGCAACGG
GlcK-R8	AGTTCAATCTTCATCATCTCG
GlcK-F5	GTAGCCACATTGTTTCCTGAC
GlcK-R6	TTGCTGAAGCTACAGTTTCC
GlcK-R4	TAAGCAAGACTAGCAGCTCC
GlcK-F7	TTGCGTAGTCGTGTTGAAGG
GlcK-R10	ATTGTCCCTTCATAAGCATCG
GlcK-F11	CGAACTGGGTGCAGATGATG
GlcK-R12	ATTCACCACGGCCTGAGAC

Таблица 2: Список праймеров для секвенирования glcK.

Активность глюкокиназы [тест А]

Была получена свежая ночная культура штамма *Streptococcus thermophilus* в M17, содержащая 30 г/л лактозы, и использовалась для инокуляции 1% (об./об.) 10 мл свежей M17 с 30 г/л лактозы. Клетки собирали центрифугированием (6000 г, 10 мин, 4 °С) при оптической плотности для 600 нм (OD600) 0,8 +/- 0,2, промывали в 5 мл холодного буфера GLCK (5 mM MgCl₂, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ [pH 7,2]) и ресуспендируют в 500 мкл холодного буфера GLCK. Ингибиторы протеаз без EDTA «cOmplete™» (Roche, ссылка на поставщика 04693132001) добавляли в буфер GLCK, как описано поставщиком. Клетки разрушали добавлением 100 мг стеклянных гранул (150-212 мкм, Sigma G1145) к 200 мкл ресуспендированных клеток и колебаниями с частотой 30 циклов/с в течение 6 минут в вибромельнице MM200 (Retsch, Наан, Германия). Клеточный дебрис и стеклянные гранулы удаляли центрифугированием (14000 г, 15 мин, 4 °С) и супернатант переносили в чистую пробирку для центрифугирования объемом 1,5 мл, которую держали на льду. Содержание общего белка определяли с использованием набора для определения белка FLUKA-Rapid (ref 51254). Активность глюкокиназы в клеточных экстрактах определяли спектрофотометрически с помощью глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G-6PDH, EC1.1.1.49): анализ, связанный с NADPH (Porter et al., 1982), по существу, как описано Pool et al., (2006). Каждый образец (5, 10 и 20 мкл) добавляли в буфер для анализа (10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ [pH 7,2], 5 mM MgCl₂, 1 mM АТФ, 20 mM глюкозы, 1 mM NADP, 1 U G-6PDH) в 250 мкл конечного объема, и смесь оставляли на 5 мин при 30 °С. Оптическую плотность при 340 нм измеряли в течение 5 минут с использованием считывающего устройства для микропланшетов Synergy HT (БИО-ТЕК). Одна единица глюкокиназы соответствует количеству фермента, который катализирует фосфорилирование 1 мкмоль

D-глюкозы до D-глюкозо-6-фосфата в минуту в условиях анализа. Активность глюкокиназы рассчитывали следующим образом:

активность глюкокиназы (Ед/г общего белкового экстракта) = $dOD \times V / [dt \times l \times \epsilon \times Q_{prot}]$, где:

- dOD - изменение оптической плотности (OD) при 340 нм

- V - объем реакции (в настоящем документе 250 мкл)

dt = время измерения (в минутах)

l = длина оптического пути (в данном случае 0,73 см)

ϵ = молярный коэффициент ослабления NADPH; H⁺ (в настоящем документе 6220 см²/мкмоль)

Q_{prot} = количество белка в кювете (в г)

Измерения были повторены трижды для каждого образца, и значения удельной активности глюкокиназы, приведенные в настоящем документе в тесте А, представляют собой среднее значение трех независимых экспериментов.

Максимальная скорость прямой реакции GlcK [тест С]

Максимальная скорость прямой реакции (V_{max}) GlcK была определена с использованием различных концентраций глюкозы (0, 5, 10, 15, 20 мМ) на неочищенном экстракте, приготовленном, как описано в «активности глюкокиназы» (тест А). Измерения были повторены для каждого образца трижды, и значения V_{max} , приведенные в настоящем документе в тесте С, представляют собой среднее значение трех независимых экспериментов. Линейная регрессия, представляющая обратную удельную скорость в зависимости от обратной концентрации глюкозы, дает обратную максимальную скорость прямой реакции на пересечении с осью Y графика.

Эффективность подкисления молока

Подкисляющие свойства штаммов *S. thermophilus* оценивали путем регистрации pH во времени ферментации молока, как описано в тесте В. pH контролировали в течение 24 часов с использованием системы CINAC (Alliance Instruments, Франция; pH-электрод Mettler 405 DPAS SC, Толедо, Испания), как описано ранее. pH измеряли и регистрировали каждые 5 минут. Используя программное обеспечение CINAC v2.07, был рассчитан угловой коэффициент между pH 6,0 и pH 5,5 (ЕдрН/мин) [угловой коэффициент pH 6-5,5].

Перенос аллеля *glcK* штамма ST0 в геном 3 других штаммов *S. thermophilus*

Продукт ПЦР длиной 1889 п.н., содержащий ген *glcK* штамма ST0, был получен с использованием праймеров GlcK-F1 (5'-GAAGCAGTTTGGGGTAGTAG-3') и GlcK-R2 (5'-GAGTTATCTACAGGAGCTGG 3'). Затем продукт ПЦР очищали с использованием набора для очистки ПЦР QIAquick (Qiagen) и элюировали в воде, не содержащей РНКазы. Концентрацию продукта ПЦР определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, MA). Размер и чистоту продукта ПЦР проверяли с помощью капиллярного гель-электрофореза в системе QIAxcel® (Qiagen, Hilden, Germany). Штаммы DGCC7710, ST1.1 и ST1.2 трансформировали продуктом ПЦР 1889

п.н. и отбирали мутанты, у которых их ген *glcK* заменен на аллель *glcK* штамма ST0 (присутствие аллеля *glcK* штамма ST0 проверяли секвенированием).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В заявке WO2013/160413 и Sørensen et al. (2016), отбор мутантов *glcK* проводили путем отбора устойчивых к 2-дезоксиглюкозе (2-DOG) мутантов из коллекции штаммов, ферментирующих галактозу (пример 2 заявки WO). Описаны три мутанта, CHCC15757 (также известный как St1-GS-1), CHCC15887 и St2-GS-1, представляющий аминокислотное изменение в их глюкокиназе, соответственно T141I, S72P и G249R. Однако было показано, что полученные мутанты влияют на их кинетику подкисления (см. Пример 4 ниже для изменения S72P).

Сообщалось, что активность глюкокиназы штаммов, экспрессирующих глюкокиназу, имеющую изменение T141I, S72P или G249R, не обнаруживается (см. Пример 4 ниже для изменения S72P). Это может объяснить кинетику замедленного подкисления, описанную в заявке WO2013/160413 и Sørensen et al. (2016). Предполагается, что метод, использованный для отбора, может объяснить наличие мутантов, экспрессирующих только глюкокиназу, обладающую нулевой глюкокиназной активностью (то есть не детектируемую). В самом деле, в штамме, ферментирующем галактозу, несущем глюкокиназу дикого типа, 2-DOG будет фосфорилироваться глюкокиназой (GlcK), которая затем не может быть использована в качестве субстрата фосфоглюкомутазой (PGM). Как следствие, 2-DOG будет токсичным для штамма, ферментирующего галактозу, в результате не только конкуренции между 2-DOG и глюкозой за сайт связывания GlcK, но также и потребления АТФ (глюкокиназой), которая не может быть регенерирована путем гликолиза. Таким образом, чтобы выжить, лучшим вариантом для штамма, ферментирующего галактозу, является выключение активности глюкокиназы. Следовательно, способ отбора, описанный в заявке WO2013/160413 и Sørensen et al. (2016), как ожидается, будет преимущественно предоставлять штаммы, ферментирующие галактозу, ген *glcK* которых не экспрессирует функциональную глюкокиназу.

Пример 1: скрининг коллекции *Streptococcus thermophilus* для штаммов, выделяющих глюкозу

Авторы настоящей заявки, желая выбрать штаммы, секретирующие глюкозу, использовали другой подход. Коллекция *Streptococcus thermophilus* была подвергнута скринингу в тесте В на наличие штаммов, способных выделять глюкозу в кисломолочном продукте. Количество 10 мМ глюкозы было использовано в качестве минимального порога для отбора. Был выбран один штамм ST0, высвобождающий 30 мМ глюкозы в ферментированном молоке с использованием теста В.

Пример 2. Идентификация мутации в гене *glcK*

Было проведено секвенирование нескольких генов - ST0-штамма, которые, как известно, участвуют в катаболизме углеводов у *S. thermophilus*, и были сопоставлены с соответствующими последовательностями генов других *Streptococcus thermophilus* нашей

коллекции.

Различие неконсервативных аминокислот, E275K, было идентифицировано в последовательности GlcK штамма ST0, которое не было обнаружено ни в одной из последовательностей GlcK других штаммов *S. thermophilus* коллекции; это различие аминокислот является результатом А в положении 823 гена *glcK* вместо G. Дальнейшее сравнение глюкокиназы, кодируемой геном *glcK* других штаммов *S. thermophilus*, подтвердило, что лизин в положении 275 (вместо глутаминовой кислоты) был уникален для ST0 и не был обнаружен ни в одном из 107 других штаммов.

Другие различия аминокислот, выявленные в выведенной глюкокиназе из этих 108 штаммов, представлены в Таблице 3. Таким образом, можно выделить 10 различных типов глюкокиназы (от GlcK типа 1 до GlcK типа 10, как указано, соответственно, в SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20). Для следующих экспериментов были отобраны 10 штаммов ST1-ST10, каждый из которых экспрессировал уникальную глюкокиназу. SEQ ID NO: 2 была взята в качестве контрольной последовательности, поскольку этот тип GlcK был обнаружен примерно в 70% из 108 проанализированных штаммов. В частности, штамм DGCC7710, депонированный в DSMZ под номером доступа DSM28255 14 января 2014 года, кодирует глюкокиназу, как определено в SEQ ID NO: 2

Следует отметить, что единственным аминокислотным различием между последовательностью глюкокиназы, кодируемой ST0-штаммом и SEQ ID NO: 2, является аминокислотное различие в положении 275.

Положение аминокислоты	21	33	38	49	64	100	131	133	137	141	144	149	152
ST1	T	E	E	E	D	V	N	N	I	T	G	A	N
ST2	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-
ST3	N	G		-	-	-	-	-	V	-	-	V	K
ST4	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-
ST5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST7	-	-	-	D	-	-	-	-	V	-	-	-	-
ST8	N	G	-	-	-	-	-	-	V	-	-	V	K
ST9	-	-	D	-	-	-	S	D	V	-	-	-	-
ST10	-	-	D	-	-	I	-	D	V	-	-	-	-
ST0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-
Положение аминокислоты	182	188	197	198	209	220	227	252	265	275	Aa diff.	% id.	
ST1	K	V	V	A	S	F	I	T	V	E	/	/	
ST2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	99.7	
ST3	-	-	I	-	-	-	L	-	-	-	7	97.8	
ST4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	99.7	
ST5	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	1	99.7	

ST6	N	-	-	T	-	-	-	-	-	-	2	99.4
ST7	-	-	-	-	-	L	L	I	-	-	5	98.4
ST8	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	6	98.1
ST9	-	-	-	-	-	L	L	I	-	-	7	97.8
ST10	-	-	-	-	-	L	L	I	I	-	8	97.5
ST0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	1	99.7
ST20	-	-	-	-	-	-	-	-	-		1	99.7

Таблица 3: Различия белка GlcK, выявленные путем сравнения последовательности белка GlcK, кодируемой 108 *S. thermophilus*, и последовательности белка GlcK, кодируемой ST0 и ST20. Перечисленные положения аминокислот выявляют все различия аминокислот между белками GlcK. Последовательность белка GlcK из ST1 (SEQ ID NO: 2) была выбрана в качестве контрольной последовательности. Аминокислотные положения, не перечисленные в этой Таблице, идентичны для всех глюкокиназ из этого исследования. Столбец «aa diff» показывает количество различий аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 2. В столбце «% id» указан процент идентичности для SEQ ID NO: 2.

Пример 3 Измерение активности глюкокиназы штамма ST0 и сравнение с другими штаммами (ST1-ST10)

Активность глюкокиназы штамма ST0 сравнивали с активностью глюкокиназы штаммов ST1-ST10, отобранных, как описано в примере 2, с использованием теста А. Результаты суммированы в Таблице 4.

Штамм	Глюкокиназо-специфическая активность (Ед/г общего белкового экстракта)		Относительная активность (% DGCC7710)
	Average	STD	
DGCC7710(ST1 тип)	2756	140	100
ST2	2250	381	82
ST3	2595	173	94
ST4	2014	105	73
ST5	ND	ND	ND
ST6	2892	354	105
ST7	2791	104	101
ST8	2471	293	90
ST9	2553	337	93
ST10	2718	280	99
ST0	977	29	35

Таблица 4: Глюкокиназо-специфическая активность 11 штаммов: 10 штаммов - ST1-ST10 - каждый представляет различный вариант белка GlcK, и ST0 идентифицирован в примере 1; ND: не определено

Эти данные показывают, что активность глюкокиназы штаммов ST1-ST10 составляет от 2014 до 2791 Ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста А. Считалось, что активность глюкокиназы выше 1800 Ед/г общего белкового экстракта представляет нормальную активность глюкокиназы. Активность глюкокиназы

штамма DGCC7710 рассматривалась как эталонная активность глюкокиназы (поскольку она экспрессирует наиболее частый тип GlcK, определяемый как SEQ ID NO: 2).

Напротив, штамм ST0, экспрессирующий белок GlcK, несущий лизин в положении 275, обладает активностью глюкокиназы, которая составляет приблизительно 977 Ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста А, то есть примерно в 3 раза меньше активности глюкокиназы штамма DGCC7710 (35%).

Эти данные показывают, что подход, сохраненный изобретателем, позволил впервые выбрать галактозо-отрицательный штамм *S. thermophilus*, экспрессирующий глюкокиназу, активность которой значительно снижена, но не равна нулю.

Пример 4: Сравнение активности глюкокиназы, V_{max} , K_m , высвобождение глюкозы и кинетика подкисления штамма DGCC7710, производного DGCC7710, несущего различие E275K, и галактозо-положительного варианта DGCC7710, несущего отсутствие замен аминокислот

Чтобы проверить, что выделение глюкозы штаммом ST0 является результатом снижения активности глюкокиназы и результатом различия аминокислот E275K, выявленного в глюкокиназе, было разработано производное штамма DGCC7710, в котором ген *glcK* кодирует глюкокиназу с глутаминовой кислотой (E) в положении 275, замененной аминокислотой лизин (K). Это производное (DGCC12534) было депонировано в DSMZ 15 августа 2017 года под номером доступа DSM32587. Последовательность его белка GlcK определена в SEQ ID NO: 22.

Параллельно был создан мутант DGCC7710, в котором серин (S) в положении 72 был заменен пролином (P), чтобы получить белок GlcK с последовательностью, определенной в SEQ ID NO: 23 [аминокислотная замена S72P; описано в штамме DSM25851 заявки WO2013/160413]. Поскольку аминокислотная замена S72P приводит к нулевой активности глюкокиназы (т.е. штамму, который не способен использовать глюкозу через глюкокиназу), мутант был ранее представлен галактозо-положительным (для того, чтобы использовать галактозу, поскольку ожидается, что галактозо-отрицательный штамм *S. thermophilus*, проявляющий нулевую активность глюкокиназы, будет нежизнеспособным). Таким образом, промотор *gal*-оперона штамма DGCC7710 предварительно подвергали мутации в соответствии с заявкой WO 2011/026863, чтобы получить промотор *gal*-оперона, имеющий последовательность, определенную в SEQ NO: 24. Был получен галактозо-положительный мутант, несущий аминокислотную замену S72P в белке GlcK и названный ST1m-*glcK0-gal+*.

Выравнивание последовательности белка глюкокиназы штаммов DGCC7710, DSM32587 и ST1m-*glcK0-gal+* раскрыто на Фигуре 1.

Активность глюкокиназы, V_{max} и K_m глюкокиназы, высвобождение глюкозы в ферментированном молоке и кинетику подкисления DGCC7710, DSM32587 и ST1m-*glcK0-gal+* штаммов определяли, как описано в разделе «Материалы и методы». Полученные результаты раскрыты в Таблицах 5-7 и на Фигуре 2 и суммированы в Таблице 8.

Штамм	Глюкокиназо-специфическая активность (Ед/г общего белкового экстракта)		Относительная активность (% DGCC7710)
	Среднее	STD	
DGCC7710	2756	140	100
DSM32587	907	32	33
ST1m-glcK0-gal+	0	/	0

Таблица 5: Глюкокиназо-специфическая активность штамма DGCC7710 и штаммов DSM32587 и ST1m-glcK0-gal+ и % активности по сравнению с глюкокиназой активностью штамма DGCC7710

Штамм	V _{max} Глюкокиназы (Ед/г общего белкового экстракта)			K _m Глюкокиназы (мМ)	
	среднее	STD	% DGCC7710	Среднее	STD
DGCC7710	2855	178	100	1319	73
DSM32587	914	21	32	1328	56
ST1m-glcK0-gal+	ND	/	ND	ND	/

Таблица 6: V_{max} глюкокиназы штамма DGCC7710 и штаммов DSM32587 и ST1m-glcK0-gal+ и% V_{max} глюкокиназы по сравнению с V_{max} глюкокиназы штамма DGCC7710 и активность K_m глюкокиназы штаммов DGCC7710, DSM32587 и ST1m-glcK0, ND: не определено

Штамм	Потребленная лактоза (мМ)	Высвобожденная глюкоза (мМ)	Высвобожденная глюкоза/Потребленная лактоза (%)
DGCC7710	55	0	0
DSM32587	83	29	35
ST1m-glcK0-gal+	160	109	68

Таблица 7: Катаболизм углеводов в молоке, ферментированном (24 часа) штаммами DGCC7710, DSM32587 или ST1m-glcK0-gal+.

Штамм	Глюкокиназо-специфическая активность (Ед/г общего белкового экстракта)	V _m Глюкокиназы (Ед/г общего белкового экстракта)	Высвобожденная глюкоза/Потребленная лактоза (%)	Угловой коэффициент рН 6-5,5 (Ед рН/мин)
DGCC7710	2756	2855	0	-0,0117
DSM32587	907	914	35	-0,0141
ST1m-glcK0-gal+	0	ND	68	-0,0077

Таблица 8: Сводная информация поведения штаммов DGCC7710, DSM32587 и ST1m-glcK0-gal+. ND: не определено

Во-первых, данные Таблицы 5 ясно показали, что замена глутаминовой кислоты (E) в положении 275 белка GlcK лизином (K) сама по себе достаточна для значительного снижения активности глюкокиназы с 2756 до 907 Ед/г (т.е. 33% активности DGCC7710) в производном DGCC7710 (DSM32587). Данные, полученные для мутанта ST1m-glcK0-gal+, подтверждают, что аминокислотной замены S72P достаточно для полной отмены активности глюкокиназы. Вместе с активностью глюкокиназы авторы изобретения также

исследовали, является ли наблюдаемое снижение активности глюкокиназы в штамме DSM32587 следствием уменьшения аффинности (K_m) глюкокиназы для ее субстрата (глюкоза) и/или уменьшение максимальной скорости прямой реакции (V_{max}) глюкокиназы. Данные Таблицы 6 подтверждают, что замена глутаминовой кислоты (E) в положении 275 белка GlcK лизином (K) сама по себе достаточна для значительного снижения V_{max} глюкокиназы с 2855 до 914 Ед/г (т.е. 32% от DGCC7710 V_{max}) в производном DGCC7710 (DSM32587). В отсутствие функциональной глюкокиназы у мутанта ST1m-glcK0-gal+ V_{max} не могла быть определена.

Данные таблицы 7 показывают, что штамм DSM32587 высвобождает 29 мМ глюкозы после ферментации молока, тогда как штамм DGCC7710, имеющий высокую активность глюкокиназы, не высвобождает значительное количество глюкозы; кроме того, штамм DSM32587 потребляет в 1,5 раза больше лактозы, чем штамм DGCC7710. Глюкоза, высвобождаемая в молоке, ферментированном с помощью DSM32587, соответствует 35% потребляемой лактозы, в то время как глюкоза, высвобождаемая в молоке, ферментированном штаммом DGCC7710, находится ниже уровня детектирования (было обнаружено, что только молоко содержит 175 мМ лактозы без какого-либо детектируемого уровня других углеводов или кислот). Эти данные показали, что штамм DSM32587, у которого активность глюкокиназы и V_{max} примерно в 3 раза снижены по сравнению с штаммом DGCC7710, компенсирует его более низкий внутриклеточный катаболизм глюкозы, потребляя в 1,5 раза больше лактозы и высвобождая 35% части глюкозы потребляемой лактозы через 24 часа. Наконец, что касается мутанта ST1m-glcK0-gal+, этот галактозо-положительный мутант потребляет почти всю лактозу, присутствующую в молоке (160 мМ из 175 мМ), и выделяет 109 мМ глюкозы, что соответствует 68% потребляемой лактозы. Предполагается, что оставшаяся часть глюкозы выводится с молоком, но повторно потребляется клеткой после транспортировки через систему PTS.

Наконец, данные Фигуры 2 показывают, что на кинетику подкисления штамма DSM32587 не оказало существенного влияния по сравнению со штаммом DGCC7710 (угловой коэффициент рН 6-5,5 составляет -0,011 Ед рН/мин для штамма DSM32587 по сравнению с - 0,0117 Ед рН/мин для штамма DGCC7710). В отличие от этого, углового коэффициента рН 6-5,5 мутанта ST1m-glcK0-gal+ был значительно измен (-0,0077 Ед рН/мин).

В целом, эти данные показывают, что чем больше снижается активность глюкокиназы и V_{max} (до 0), тем больше штаммы потребляют лактозу и тем больше выделяется глюкозы. Эти данные подтверждают, что отсутствие функциональной глюкокиназы, хотя и обеспечивает высокое количество выделяемой глюкозы, значительно влияет на кинетику подкисления у галактозо-положительного *S. thermophilus*. Авторы настоящего изобретения неожиданно впервые показали, что комбинация «галактозо-отрицательного» признака штамма *S. thermophilus* и «значительно сниженной, но не равной нулю активности глюкокиназы» в этом штамме вместе со «значительно

сниженной, но не равной нулю V_{max} глюкокиназы» в этом штамме позволяет получить штаммы со свойствами выделения глюкозы (выше 10 мМ) в молоке, ферментированном этими штаммами.

Пример 5: сравнение активности глюкокиназы, V_{max} , K_m , высвобождения глюкозы и кинетики подкисления 2 штаммов *S. thermophilus*, экспрессирующих стандартную активность глюкокиназы, и их соответствующих вариантов, несущих различие E275K

Чтобы проверить, что поведение галактозо-отрицательного штамма *S. thermophilus* - обладающего значительно сниженной, но не равной нулю активностью глюкокиназы - в отношении высвобождения глюкозы после ферментации и кинетики подкисления, не ограниченной генетическим фоном DGCC7710, было введено различие аминокислот E275K в 2 галактозо-отрицательных *S. thermophilus*, имеющих 2 различных генетических фона: штамм ST1.1 и штамм ST1.2. Соответствующие мутанты были названы ST1.1m-glcK и ST1.2m-glcK. Последовательность GlcK этих 2 мутантов является такой, как определено в SEQ ID NO: 22.

Активность глюкокиназы, V_{max} и K_m глюкокиназы, высвобождение глюкозы в ферментированном молоке и кинетику подкисления мутантов ST1.1m-glcK и ST1.2m-glcK определяли, как описано в разделе «Материалы и методы», и сравнивали с таковыми штаммов ST1.1 и ST1.2. Полученные результаты раскрыты в Таблицах 9-11 и на Фигурах 3А и 3В и суммированы в Таблице 12.

Штамм	Глюкокиназо-специфическая активность (Ед/г общего белкового экстракта)		Относительная активность (% DGCC7710)
	Среднее	STD	
ST1.1	2584	153	94
ST1.1m-glcK	755	82	27
ST1.2	2239	276	81
ST1.2m-glcK	453	27	16

Таблица 9: Глюкокиназо-специфическая активность штаммов ST1.1 и ST1.2 и их соответствующих E275K-мутантов и % активности по сравнению с глюкокиназой штамма DGCC7710

Штамм	V_{max} Глюкокиназы (Ед/г общего белкового экстракта)			K_m Глюкокиназы (мМ)	
	среднее	STD	% DGCC7710	среднее	STD
ST1.1	2687	172	94	2011	428
ST1.1m-glcK	795	130	28	1923	665
ST1.2	2431	316	85	2532	60
ST1.2m-glcK	501	32	18	2397	452

Таблица 10: V_{max} глюкокиназы штаммов ST1.1 и ST1.2 и их соответствующих мутантов E275K и % V_{max} глюкокиназы по сравнению с V_{max} глюкокиназы штамма DGCC7710 и K_m -активность глюкокиназы штаммов ST1.1 и ST1.2 и их соответствующих E275K-мутантов

Штамм	Потребленная лактоза (мМ)	Высвобожденная глюкоза (мМ)	Высвобожденная глюкоза/Потребленная лактоза (%)
ST1.1	54	1	1
ST1.1m-glcK	86	30	35
ST1.2	54	0	1
ST1.2m-glcK	69	18	26

Таблица 11 Углеводный катаболизм в молоке, ферментированном (24 ч) штаммом ST1.1, штаммом ST1.2 и их соответствующими E275K-мутантами

Штамм	Глюкокиназо-специфическая активность (Ед/г общего белкового экстракта)	V _m Глюкокиназы	Высвобожденная глюкоза/Потребленная лактоза (%)	Угловой коэффициент рН6-5,5 (Ед рН/мин)
ST1.1	2584	2687	1	-0,0160
ST1.1m-glcK	755	795	35	-0,0169
ST1.2	2239	2431	1	-0,0136
ST1.2m-glcK	453	501	26	-0,0150

Таблица 12: Сводная информация поведения штаммов ST1.1 и ST1.2 и их соответствующих E275K-мутантов

Во-первых, данные Таблицы 9 ясно показали, что замены глутаминовой кислоты (E) в положении 275 белка GlcK лизином (K) достаточно для снижения активности глюкокиназы с 2584 до 755U/г на генетическом фоне ST1.1 (т.е. активность глюкокиназы, которая составляет 27% от активности DGCC7710) и от 2239 до 453 Ед/г на генетическом фоне ST1.2, соответственно (т.е. активность глюкокиназы, которая составляет 16% активности DGCC7710). Аналогичное наблюдение было сделано для V_{max} глюкокиназы, для которой замена глутаминовой кислоты (E) в положении 275 белка GlcK на лизин (K) привела к снижению V_{max} глюкокиназы с 2687 до 795 Ед/г на генетическом фоне ST1.1 (т.е. 28% DGCC7710) и от 2431 до 501 на генетическом фоне ST1.2, соответственно (т.е. 18% DGCC7710) (Таблица 10).

Данные Таблицы 11 показывают, что штаммы ST1.1m-glcK и ST1.2m-glcK-, имеющие значительно сниженную, но не равную нулю активность глюкокиназы, и значительно сниженную, но не равную нулю V_{max} - высвобождают 30 и 18 мМ глюкозы, соответственно, после ферментации молока, тогда как штаммы ST1.1 и ST1.2, обладающие высокой активностью глюкокиназы, не высвобождают значительного количества глюкозы. Кроме того, штаммы ST1.1m-glcK и ST1.2m-glcK потребляют в 1,6 и 1,3 раза больше лактозы, чем штаммы ST1.1 и ST1.2, соответственно. Глюкоза, высвобождающаяся в молоке, ферментированном штаммами ST1.1m-glcK и ST1.2m-glcK, соответствует 35% и 26%, соответственно, потребленной лактозы, в то время как уровень глюкозы, высвобождаемой в молоке, ферментированном штаммами ST1.1 и ST1.2, ниже уровня детектирования или очень близок к нулю. Эти данные показали, что ST1.1m-glcK и ST1.2m-glcK-, у которых активность глюкокиназы и V_{max} по меньшей мере в 3 раза снижена по сравнению с таковыми у штаммов ST1.1 и ST1.2 - компенсирует их более

низкий внутриклеточный катаболизм глюкозы, потребляя от 1,3 до 1,6 больше лактозы и высвобождая от 26 до 35% глюкозной части потребленной лактозы через 24 часа.

Наконец, данные на Фигуре 3 показывают, что на кинетику подкисления штаммов ST1.1m-glcK и ST1.2m-glcK не оказало значительного влияния по сравнению со штаммами ST1.1 и ST1.2, соответственно (угловой коэффициент pH 6 -5,5 от -0,0169 Ед pH/мин для штамма ST1.1m-glcK по сравнению с -0,0160 Ед pH/мин для штамма ST1.1, и угловой коэффициент pH 6-5,5 составляет -0,0150 Ед pH/мин для штамма ST1.2m-glcK по сравнению с -0,0136 Ед pH/мин для штамма ST1.1).

В целом, эти данные подтверждают, что введение различия E275K в белок GlcK 2 галактозо-отрицательных штаммов *S. thermophilus* с различным генетическим фоном является достаточным для обеспечения ферментированного молока интересным уровнем глюкозы.

В заключение, эта заявка является первой, в которой сообщается, что комбинация «галактозо-отрицательного» признака в штамме *S. thermophilus* со «значительно сниженной, но не равной нулю активностью глюкокиназы» в этом штамме вместе со «значительно сниженной, но не равной нулю V_{max} глюкокиназы» в этом штамме позволяет получать лактозо-положительные, галактозо-отрицательные штаммы *S. thermophilus*, которые могут использоваться для обеспечения ферментированного молока с высвобождаемой/накопленной глюкозой.

Пример 6. Идентификация другого мутированного белка GlcK.

Был идентифицирован штамм *Streptococcus thermophilus* (ST20), ген glcK которого содержит неконсервативное аминокислотное различие, G144S. Это аминокислотное изменение не было обнаружено ни в одной из последовательностей GlcK других штаммов *S. thermophilus* коллекции (типы GlcK ST1-ST10). Следует отметить, что единственным аминокислотным различием между последовательностью глюкокиназы, кодируемой штаммом ST20, и SEQ ID NO: 2 является аминокислотное различие в положении 144 (Таблица 3).

Пример 7. Характеристика отношения активности бета-галактозидазы к активности глюкокиназы у мутантов glcK

В нескольких патентных заявках (WO 2015/0149940, WO2013/160413 и WO2017/103051) сообщается о штаммах *Streptococcus thermophilus*, высвобождающих глюкозу. Однако штаммы, раскрытые в этих заявках, являются галактозо-положительными штаммами, фенотип, который не обязательно желателен и, как было показано, нестабилен, в частности, когда штаммы культивируют на лактозосодержащей среде.

Как упомянуто выше, результаты показывают, что активность глюкокиназы в штамме (которая снижена, но не равна нулю, как определено в настоящем документе) является интересным параметром для идентификации штаммов *Streptococcus thermophilus*, высвобождающих глюкозу. Однако этот параметр может быть недостаточным, если его использовать отдельно, чтобы идентифицировать *Streptococcus thermophilus*,

высвобождающий глюкозу, мутированную в гене (генах), отличном от гена *glcK*.

Таким образом, авторы изобретения наблюдали и проверяли, что, помимо одной только активности глюкокиназы, отношение активности бета-галактозидазы к активности глюкокиназы было отличным параметром не только для идентификации *Streptococcus thermophilus*, высвобождающего глюкозу, мутированную в ее гене *glcK*, но также для идентификации *Streptococcus thermophilus*, высвобождающего глюкозу, мутированную в других генах.

Таким образом, это отношение было рассчитано следующим образом:

- определение активности бета-галактозидазы (Ед/г белка) в штамме с помощью теста D
- определение активности глюкокиназы (Ед/г белка) в указанном штамме с помощью теста E; и
- вычисление отношения активности бета-галактозидазы к активности глюкокиназы в указанном штамме.

Это отношение рассчитывали для штамма DGCC7710, штамма DSM32587 (несущего мутацию E275K в его гене *glcK*), штамма ST1.1, штамма ST1.1m-*glcK* (несущего мутацию E275K в его гене *glcK*), штамма ST20 (несущий мутацию G144S в его гене *glcK*) и штамма ST5. Следует отметить, что в отсутствие функциональной глюкокиназы у мутанта ST1m-*glcK0-gal+* (активность GlcK менее чем 0,1) это отношение не могло быть определено. Результаты суммированы в Таблице 13 и на Фигуре 4.

Высвобождение глюкозы в ферментированном продукте и кинетику подкисления этих 6 штаммов также определяли, как описано в разделе «Материалы и методы», и суммировали в Таблице 14 и сравнивали с поведением ST1m-*glcK0-gal+*.

Штамм	GlcK активность (Ед/г белка)		Beta Gal активность (Ед/г белка)		Отношение активности бета-галактозидазы/к активности глюкокиназы
	Среднее	STD	Среднее	STD	
DGCC7710	1692	298	$5,20 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-3}$	$3,07 \times 10^{-6}$
DSM32587	876	126	$9,95 \times 10^{-3}$	$3,92 \times 10^{-4}$	$1,14 \times 10^{-5}$
ST1.1	1425	189	$3,57 \times 10^{-3}$	$2,77 \times 10^{-4}$	$2,50 \times 10^{-6}$
ST1.1m- <i>glcK</i>	520	55	$6,01 \times 10^{-3}$	$3,82 \times 10^{-4}$	$1,16 \times 10^{-5}$
ST20	889	99	$8,01 \times 10^{-3}$	$2,01 \times 10^{-4}$	$9,01 \times 10^{-6}$
ST5	1168	89	$3,09 \times 10^{-3}$	$1,88 \times 10^{-4}$	$2,64 \times 10^{-6}$

Таблица 13: Сводная информация о соотношении активности бета-галактозидазы к активности глюкокиназы в штаммах DGCC7710, DSM32587, ST1.1, ST1.1m-*glcK*, ST20 и ST5

Штамм	отношение активности бета-галактозидазы/к активности глюкокиназы	Высвобождение глюкозы (мМ)(тест В)	Угловой коэффициент рН 6-5.5 (Ед рН/мин)
DGCC7710	$3,07 \times 10^{-6}$	< 0,1	-0,0140
DSM32587	$1,14 \times 10^{-5}$	32	-0,0148

ST1.1	$2,50 \times 10^{-6}$	< 0,1	-0,0180
ST1.1m-glcK	$1,16 \times 10^{-5}$	35	-0,0168
ST20	$9,01 \times 10^{-6}$	49	-0,0121
ST5	$2,64 \times 10^{-6}$	< 0,1	-0,0065
ST1m-glcK0-gal+	/	68	-0,0077

Таблица 14: Сводная информация поведения штаммов DGCC7710, DSM32587, ST1.1, ST1.1m-glcK, ST20, ST5 и ST1m-glcK0-gal+

Эти данные показывают, что все штаммы, высвобождающие глюкозу (по меньшей мере, 32 мМ), демонстрируют отношение активности бета-галактозидазы к активности глюкокиназы, которое равно или превышает 9×10^{-6} , тогда как все штаммы, для которых уровень глюкозы не детектируется, демонстрируют отношение активности бета-галактозидазы к активности глюкокиназы, составляющее примерно от 2×10^{-6} до 3×10^{-6} .

Это подтверждает, что отношение активности бета-галактозидазы к активности глюкокиназы (как рассчитано в настоящем документе) является отличным параметром для выявления лактозо-положительных галактозо-отрицательных штаммов *Streptococcus thermophilus*, высвобождающих значительное количество глюкозы.

Пример 8: характеристика отношения активности бета-галактозидазы к активности глюкокиназы у мутанта *ссрА*

На основании заключения примера 7 авторы настоящего изобретения определили бета-галактозидазную активность (тест D) по отношению к активности глюкокиназы (тест E) лактозо-положительных галактозо-отрицательных штаммов *Streptococcus thermophilus* (не мутированных в своем гене *glcK*) собственной коллекции DuPont.

Один штамм (ST30), как было показано, демонстрирует такое отношение. Секвенирование генома этого штамма выявило мутацию в гене *ссрА*: делеция нуклеотида А в участке из 7 нуклеотидов А в положениях 114-120 (SEQ ID NO: 71), приводящая к сдвигу открытой рамки считывания гена *ссрА*.

Эта мутация была введена в геном штамма DGCC7710 для получения штамма ST1m-*ссрА* (то есть было сконструировано первое производное DGCC7710, в котором ген *ссрА* штамма DGCC7710 был заменен мутированным геном *ссрА*, как определено в SEQ ID NO: 71). Та же самая мутация была введена в геном штамма ST1.1, чтобы получить штамм ST1.1m-*ссрА*. Эта мутация была также введена в DSM32587 (то есть DGCC7710, несущий мутантный ген *glcK*, кодирующий глюкокиназу с заменой E275K), чтобы получить ST1m-*glcK*+*ссрА*.

Отношение активности бета-галактозидазы к активности глюкокиназы рассчитывали для штамма DGCC7710, штамма ST1m-*ссрА*, штамма ST1.1 и штамма ST1.1m-*ссрА*. Результаты суммированы в Таблице 15 и на Фигуре 4. Высвобождение глюкозы в ферментированном молоке и кинетику подкисления этих 4 штаммов также определяли, как описано в разделе «Материалы и методы», и суммировано в Таблице 16.

Штамм	GlcK активность (Ед/г белка)	Beta Gal активность (Ед/г белка)	Отношение активности бета-галактозидазы/к
-------	---------------------------------	-------------------------------------	--

	Moу	SD	Moу	SD	активности глюкокиназы
DGCC7710	1692	298	$5,20 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-3}$	$3,07 \times 10^{-6}$
ST1m-срА	1871	310	$1,84 \times 10^{-2}$	$2,25 \times 10^{-3}$	$9,82 \times 10^{-6}$
ST1.1	1425	189	$3,57 \times 10^{-3}$	$2,77 \times 10^{-4}$	$2,50 \times 10^{-6}$
ST1.1m-срА	1701	290	$1,03 \times 10^{-2}$	$1,44 \times 10^{-3}$	$6,07 \times 10^{-6}$

Таблица 15: Сводная информация о соотношении активности бета-галактозидазы к активности глюкокиназы в штаммах DGCC7710, ST1m-срА, ST1.1 и ST1.1m-срА

Штамм	Отношение активности бета-галактозидазы/к активности глюкокиназы	Глюкоза (мМ)	Угловой коэффициент рН 6-5.5 (ЕдрН/мин)
DGCC7710	$3,07 \times 10^{-6}$	< 0,1	-0,0140
ST1m-срА	$9,82 \times 10^{-6}$	12	-0,0125
ST1m-КОсрА	nd	28	-0,0084
ST1m-glck+срА	nd	39	-0,0100
ST1.1	$2,50 \times 10^{-6}$	< 0,1	-0,0180
ST1.1m-срА	$6,07 \times 10^{-6}$	14	-0,0160

Таблица 16: Сводная информация поведения DGCC7710, ST1m-срА, ST1m-КОсрА, ST1m-glck+срА, ST1.1 и ST1.1m-срА (nd: не определено)

Во-первых, эти данные подтверждают, что выявленная мутация срА приводит к тому, что штамм демонстрирует отношение активности бета-галактозидазы к активности глюкокиназы 6×10^{-6} и $9,8 \times 10^{-6}$, тогда как штаммы, не мутированные в гене срА, демонстрируют отношение бета-галактозидазной активности к глюкокиназной активности, составляющее $2,5 \times 10^{-6}$ и 3×10^{-6} . Затем эти данные также подтверждают, что штаммы, несущие мутацию срА, высвобождают глюкозу во время ферментации молока, в отличие от штаммов, не мутированных в гене срА. Наконец, эти данные также показывают, что на кинетику подкисления штаммов, несущих мутацию срА, это не влияет.

В целом, эти результаты подтверждают, что отношение активности бета-галактозидазы к активности глюкокиназы, как определено в настоящем документе, является отличным параметром для идентификации лактозо-положительных галактозо-отрицательных штаммов *Streptococcus thermophilus*, высвобождающих значительное количество глюкозы.

Результаты также показывают, что авторы изобретения идентифицировали, в дополнение к мутациям гена glck, кодирующего глюкокиназу, активность которой снижена, но не равна нулю, другой ген - ген срА - который может быть мутирован (но не нокаутирован) с получением штамма, высвобождающего глюкозу и имеющего хорошую кинетику подкисления. Поведение штамма DGCC7710, несущего мутированный ген срА (SEQ ID NO: 71) [ST1m-срА], сравнивали с поведением производного DGCC7710, в который был нокаутирован ген срА штамма DGCC7710 (ST1m-КОсрА). Интересно, что это сравнение показывает, что ST1m-КОсрА оказывает существенное влияние на его

кинетику подкисления, тогда как штамм ST1m-срА нет (Таблица 16), показывая, что мутация гена срА в штамме ST1m-срА отличается от чистого нокаута гена.

Наконец, введение как мутированного гена glcK, так и мутированного гена срА в штамм DGCC7710 показывает количество глюкозы (39 мМ), которое увеличивается по сравнению со штаммом DSM32587 (Таблица 14) и штаммом ST1m-срА.

Пример 9: характеристика отношения активности бета-галактозидазы к активности глюкокиназы у штаммов, мутированных в гене manL, и в обоих генах срА и manL, и сравнение с отношением в штаммах, мутированных в гене glcK или гене срА

В дальнейших экспериментах авторы изобретения идентифицировали лактозоположительные галактозо-отрицательные штаммы *Streptococcus thermophilus* (не мутированные в их гене glcK), несущие мутацию в гене manL (ген, кодирующий белок ПABMan, белок, который является частью маннозо-глюкозо-специфической PTS). Мутация гена manL представляет собой замену нуклеотида G на нуклеотид T в положении 916, что приводит к появлению стоп-кодона в положении 306 белка [ПABMan305] (SEQ ID NO: 155).

Эта мутация была введена в фон штамма DGCC7710 для получения штамма ST1m-manL; та же самая мутация была введена в фон штамма ST1.1, чтобы получить штамм ST1.1m-manL. Кроме того, мутантный ген manL был введен в штамм ST1m-срА и штамм ST1.1m-срА, подробно описанный в Примере 8 (то есть штаммы DGCC7710 и ST1.1, несущие мутированный ген срА).

Отношение активности бета-галактозидазы к активности глюкокиназы рассчитывали для штамма DGCC7710, штамма ST1m-manL, штамма ST1m-срА, штамма ST1m-срА+manL, штамма ST1.1, штамма ST1.1m-manL, штамма ST1.1m-срА и штамма ST1.1m-срА+manL. Результаты суммированы в Таблице 17 и на Фигуре 4. Высвобождение глюкозы в ферментированном молоке и кинетику подкисления этих 8 штаммов также определяли, как описано в разделе «Материалы и методы», и суммировано в Таблице 18.

Штамм	Мутированные гены	GlcK активность (Ед/г белка)		Beta Gal активность (Ед/г белка)		Отношение активности бета-галактозидазы/к активности глюкокиназы
		Среднее	STD	Среднее	STD	
DGCC7710	/	1692	298	$5,20 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-3}$	$3,07 \times 10^{-6}$
ST1m-срА	срА	1871	310	$1,84 \times 10^{-2}$	$2,25 \times 10^{-3}$	$9,82 \times 10^{-6}$
ST1m-manL	manL	1667	147	$4,24 \times 10^{-3}$	$1,89 \times 10^{-4}$	$2,54 \times 10^{-6}$
ST1m-срА+manL	срА+manL	1765	129	$1,61 \times 10^{-2}$	$4,76 \times 10^{-4}$	$9,11 \times 10^{-6}$
ST1.1	/	1425	189	$3,57 \times 10^{-3}$	$2,77 \times 10^{-4}$	$2,50 \times 10^{-6}$
ST1.1m-срА	срА	1701	290	$1,03 \times 10^{-2}$	$1,44 \times 10^{-3}$	$6,07 \times 10^{-6}$
ST1.1m-manL	manL	1413	148	$3,27 \times 10^{-3}$	$1,99 \times 10^{-4}$	$2,32 \times 10^{-6}$

ST1m- ссрA+manL	ссрA+man	1547	120	$1,47 \times 10^{-2}$	$2,43 \times 10^{-3}$	$9,49 \times 10^{-6}$
--------------------	----------	------	-----	-----------------------	-----------------------	-----------------------

Таблица 17: Сводная информация отношения активности бета-галактозидазы к активности глюкокиназы в штаммах DGCC7710, ST1m-manL, ST1m-ссрA, ST1m-ссрA+manL, ST1.1, ST1.1m-manL, ST1.1m-ссрA и ST1.1m-ссрA+manL

Штамм	Мутированны е гены	Отношение	Глюкоза (мМ)	Угловой коэффициент рН 6-5,5 (Ед рН/мин)
DGCC7710	/	$3,07 \times 10^{-6}$	< 0,1	-0,0140
ST1m-ссрA	ссрA	$9,82 \times 10^{-6}$	12	-0,0125
ST1m-manL	manL	$2,54 \times 10^{-6}$	17	-0,0104
ST1m-ссрA+manL	ссрA+manL	$9,11 \times 10^{-6}$	124	-0,0089
ST1.1	/	$2,50 \times 10^{-6}$	< 0,1	-0,0180
ST1.1m-ссрA	ссрA	$6,07 \times 10^{-6}$	14	-0,0160
ST1.1m-manL	manL	$2,32 \times 10^{-6}$	7	-0,0123
ST1.1m-ссрA+manL	ссрA+manL	$9,49 \times 10^{-6}$	107	-0,0091

Таблица 18: Сводная информация поведения штаммов DGCC7710, ST1m-manL, ST1m-ссрA, ST1m-ссрA+manL, ST1.1, ST1.1m-manL, ST1.1m-ссрA и ST1.1m-ссрA+manL

Во-первых, эти данные показывают, что штаммы, мутированные только в их гене manL (ST1m+manL или ST1.1m-manL), высвобождают глюкозу во время ферментации молока, хотя они не демонстрируют отношения активности бета-галактозидазы к активности глюкокиназы, которое более или менее похоже для штамма DGCC7710 или ST1.1. Это показывает, что мутация manL не влияет на активность глюкокиназы и/или активность бета-галактозидазы в штаммах *Streptococcus thermophilus*.

Эти данные также показывают, что штаммы, мутированные как в гене ссрA, так и в гене manL (штаммы ST1m-ссрA+manL и ST1.1m-ссрA+manL), демонстрируют отношение активности бета-галактозидазы к активности глюкокиназы, которая аналогична или выше, чем у штаммов, мутированных только в гене ссрA (штаммы ST1m-ссрA и ST1.1m-ссрA). Это подтверждает, что отношение активности бета-галактозидазы к активности глюкокиназы (как определено в настоящем документе) может быть использовано для генерации и идентификации дальнейших мутаций в гене glcK, гене ссрA и генах man, путем объединения этих мутированных генов, которые должны быть проанализированы, с геном glcK, геном ссрA или геном (генами) man с известными мутациями (и определение отношения).

Интересно, что двойные (ссрA+manL) мутанты высвобождают глюкозу в концентрации выше 100 мМ, которая в 7-10 раз превышает концентрацию глюкозы в штаммах ST1m-ссрA и ST1.1m-ссрA. Эти данные показывают, что существует синергизм в отношении концентрации высвобождаемой глюкозы [концентрация высвобождаемой глюкозы с использованием двойного мутанта намного больше, чем добавление концентрации высвобождаемой глюкозы с использованием мутантных по ссрA штаммов и

концентрации высвобождаемой глюкозы с использованием мутантных штаммов]. Хотя кинетика подкисления этих штаммов с двойной мутацией подвергается влиянию, концентрация глюкозы, высвобождаемой во время ферментации, делает эти штаммы с двойной мутацией промышленно полезными. Эти данные подтверждают, что отношение активности бета-галактозидазы к активности глюкокиназы (как определено в настоящем документе) может использоваться для идентификации лактозо-положительных галактозо-отрицательных штаммов *Streptococcus thermophilus*, высвобождающих значительное количество глюкозы.

Наконец, указанная в настоящем документе связь между отношением активности бета-галактозидазы к активности глюкокиназы и высвобождением глюкозы во время ферментации молока может быть использована для идентификации других генов, мутация которых приводит к определенному в настоящем документе отношению, с целью создания большего количества лактозо-положительных галактозо-отрицательных штаммов *Streptococcus thermophilus*, высвобождающих глюкозу.

Пример 10: высвобождение глюкозы из различных мутированных лактозо-положительных галактозо-отрицательных штаммов *Streptococcus thermophilus*

На основании идентификации мутации *manL*, усиливающей эффект высвобождения глюкозы мутированного гена *ссрА* в лактозо-положительных, галактозо-отрицательных штаммах *Streptococcus thermophilus*, авторы изобретения идентифицировали другие мутации в *manM* (кодирующий белок ПСMan) и *ManN* (кодирующий белок IIDMan):

- мутированный ген *manM* с заменой нуклеотида G на нуклеотид T в положении 625, приводящий к стоп-кодону в положении 209, как определено в SEQ ID NO: 201;

- мутированный ген *manN* со вставкой нуклеотида A в участок из 5 нуклеотидов A в положениях 37-41 (приводящий к участку из 6 нуклеотидов A, сдвигу рамки и укорачиванию белка IIDMan в положении 28), как определено в SEQ ID NO: 250;

Двойные и тройные мутанты штаммов, основанные на следующих мутированных генах, были сконструированы на фоне DGCC7710 (ST1) или на фоне ST1.1.

- ST1m-*manM*: производное DGCC7710, в котором ген *manM* штамма DGCC7710 был заменен мутированным геном *manM*, как определено в SEQ ID NO: 201;

- ST1m-*manN*: производное DGCC7710, в котором ген *manN* был заменен мутированным геном *manN*, как определено в SEQ ID NO: 250;

- ST1m-*glcK+manM*: производное DSM32587 (несущее ген *glcK*, кодирующий глюкокиназу с заменой E275K; пример 2), в котором ген *manM* был заменен мутированным геном *manM*, как определено в SEQ ID NO: 201;

- ST1m-*ссрА+manM*: производное ST1m-*ссрА* (DGCC7710, несущее мутированный ген *ссрА*, как определено в SEQ ID NO: 71; пример 8), в котором ген *manM* был заменен мутированным геном *manM*, как определено в SEQ ID NO: 201;

- ST1m-*ссрА+manN*: производное ST1m-*ссрА*, в котором ген *manN* был заменен мутированным геном *manN*, как определено в SEQ ID NO: 250;

- ST1m-glcK+ccpA+manM: производное DSM32587, в которое ген ccpA был заменен мутированным геном ccpA, как определено в SEQ ID NO: 71, и ген manM был заменен мутированным геном manM, как определено в SEQ ID NO: 201; и

- ST1.1m-glcK+manM: производное ST1.1m-glcK (штамм ST1.1, несущий ген glcK, кодирующий глюкокиназу с заменой E275K; пример 2), в котором ген manM был заменен мутированным геном manM, как определено в SEQ ID NO: 201.

Высвобождение глюкозы в ферментированном молоке и кинетика подкисления этих 7 дополнительных штаммов и штаммов, описанных в предыдущих примерах, были определены, как описано в разделе «Материалы и методы», и суммированы в Таблице 19.

Штамм	Мутированные гены	Глюкоза (мМ)	Угловой коэффициент рН 6-5,5 (Ед рН/мин)
DGCC7710	/	< 0,1	-0,0140
DSM32587	GlcK275	32	-0,0148
ST1m-ccpA	ccpA	12	-0,0125
ST1m-glcK+ccpA	GlcK275+ccpA	39	-0,0100
ST1m-manL	manL	17	-0,0104
ST1m-manM	manM	18	-0,0089
ST1m-manN	manN	13	-0,0095
ST1m-glcK+manM	GlcK275+manM	112	-0,0104
ST1m-ccpA+manL	ccpA+manL	124	-0,0089
ST1m-ccpA+manM	ccpA+manM	124	-0,0082
ST1m-ccpA+manN	ccpA+manN	123	-0,0109
ST1m-glcK+ccpA+manM	GlcK275+ccpA+manM	125	-0,0092
ST20	GlcK144	49	-0,0124
ST1.1	/	< 0,1	-0,0180
ST1.1m-glcK	GlcK275	35	-0,0168
ST1.1m-ccpA	ccpA	14	-0,0160
ST1.1m-manL	manL	7	-0,0123
ST1.1m-glcK+manM	glcK275+manM	89	-0,0140
ST1.1m-ccpA+manL	ccpA+manL	107	-0,0091

Таблица 19: Сводная информация поведения DGCC7710, штаммов ST1.1 и их мутантов (nd: не определено)

Эти данные показывают, что, хотя мутанты с одним man (manL, manM или ManN) высвобождают глюкозу в диапазоне 7 и 18 мМ, введение этих мутированных генов manL, manM или manN в штаммы, несущие мутации в гене glcK и/или в гене ccpA, приводит к двойным или тройным мутантам, высвобождающим от 89 до 125 мМ глюкозы. Эти наблюдения подтверждают усиление влияния мутированных генов man на высвобождение глюкозы.

Эти данные также подтверждают, что мутированные гены могут быть успешно идентифицированы с использованием активности бета-галактозидазы по сравнению с

активностью глюкокиназы, как определено в настоящем документе, и затем объединены для создания штаммов, высвобождающих значительное количество глюкозы во время ферментации молока. Определение того, что это отношение является отличным параметром, связанным с высвобождением глюкозы, открывает путь не только для генерации и идентификации дальнейших мутаций в гене *glcK*, гене *ссрА*, гене *manL*, гене *manM* и гене *manN*, но также в любом другом интересующем гене (до тех пор, пока не будет достигнуто минимальное значение отношения, как определено).

Последовательности

SEQ ID NO:2

MSKLLGIDLGGTTVKFGILTADGEVQEKWAIETNTFENGSHIVPDIVESLKHRLE
LYGLTAEDFIGIGMGSPGAVDRENKTVTGA FNLNWAETQEVGSVIEKELGIPFAIDNDA
NVAALGERWVGAGANNRNVVFITLGTGVGGGVIADGNLIHGVAGAGGEIGHIIVPDT
GFECTCGNKGLETVASATGIVRVAHHLAEKYEGNSSIKA AVDN GEFVTSKDIIVAATE
GDKFADSIVDKVSKYLGLATANISNILNPDSVVIGGGVSAAGEFLRSRVEGYFTRYAFPQ
VRRTTKVKLAELGNDAGIIGAASLAYSIDK

SEQ ID NO:22

MSKLLGIDLGGTTVKFGILTADGEVQEKWAIETNTFENGSHIVPDIVESLKHRLE
LYGLTAEDFIGIGMGSPGAVDRENKTVTGA FNLNWAETQEVGSVIEKELGIPFAIDNDA
NVAALGERWVGAGANNRNVVFITLGTGVGGGVIADGNLIHGVAGAGGEIGHIIVPDT
GFECTCGNKGLETVASATGIVRVAHHLAEKYEGNSSIKA AVDN GEFVTSKDIIVAATE
GDKFADSIVDKVSKYLGLATANISNILNPDSVVIGGGVSAAGKFLRSRVEGYFTRYAFPQ
VRRTTKVKLAELGNDAGIIGAASLAYSIDK

SEQ ID NO:45

MSKLLGIDLGGTTVKFGILTADGEVQEKWAIETNTFENGSHIVPDIVESLKHRLE
LYGLTAEDFIGIGMGSPGAVDRENKTVTGA FNLNWAETQEVGSVIEKELGIPFAIDNDA
NVAALGERWVGAGANNRNVVFITLGTGVSGGVIADGNLIHGVAGAGGEIGHIIVPDTG
FECTCGNKGLETVASATGIVRVAHHLAEKYEGNSSIKA AVDN GEFVTSKDIIVAATEG
DKFADSIVDKVSKYLGLATANISNILNPDSVVIGGGVSAAGEFLRSRVEGYFTRYAFPQV
RRTTKVKLAELGNDAGIIGAASLAYSIDK

SEQ ID NO:23

MSKLLGIDLGGTTVKFGILTADGEVQEKWAIETNTFENGSHIVPDIVESLKHRLE
LYGLTAEDFIGIGMGPPGAVDRENKTVTGA FNLNWAETQEVGSVIEKELGIPFAIDNDA
NVAALGERWVGAGANNRNVVFITLGTGVGGGVIADGNLIHGVAGAGGEIGHIIVPDT
GFECTCGNKGLETVASATGIVRVAHHLAEKYEGNSSIKA AVDN GEFVTSKDIIVAATE
GDKFADSIVDKVSKYLGLATANISNILNPDSVVIGGGVSAAGEFLRSRVEGYFTRYAFPQ
VRRTTKVKLAELGNDAGIIGAASLAYSIDK

SEQ ID NO:65

ATGAATACTGATGAAACAATCACAATTTATGATGTAGCGCGTGAAGCTGGAG
TATCGATGGCAACTGTTTCTCGTGTGTAAATGGTAACAAAAACGTAAGAAAAC
ACCCGAAAAAAGTGCTCGAAGTCATTGATCGTTTGGATTACCGTCCAAATGCGGTT

GCGCGTGGCTTGGCAAGTAAAAAACAACACTACTGTAGGAGTTGTCATTCCAAATATT
 GTAAATAGCTATTTTGCTACTCTAGCTAAAGGTATTGATGACATTGCAACCATGTAT
 AAGTATAATATTGTTCTTGCTTCCAGTGATGATAATGAGGATCATGAAGTTACAGTC
 ATTCATTCTCTAATTTCTAAACAAGTTGATGGTATTATTTTTATGGGACACCATCTGA
 CAGAAAAATCCGTGCAGAATTCTCTCGTACCCGTACACCGATTGTTCTAGCAGGAA
 CAGTTGATCTCGAACACCAATTACCAAGTGTTAACATCGACTATAAAGCTGCCGTTG
 AGGATTGTGTAACGCAACTTGCTAAAAATAATGAAAAGGTTGCCTTTGTATCAGGAC
 CACTAATTGATGATATTAATGGCAAACACTACGTTTGGCCGGGTATAAGTCTGGACTTG
 AAAAGAATAATTTGAGCTACAACGAAGGACTTGTCTTTGAAGCTAAATATAGCTAT
 AAAGACGGCTTTGAGTTAGCACAACGTGTCTTGAACCTCTGGTGCCACTGCTGCCTAT
 GTTGGGGAAGATGAATTGGCTGCAGGTCTCTTGAATGGCCTCTTTGCTGCAGGCAA
 TCAGTTCCAGAAGATTTCGAAATCATCACAAGCAATGATTCACCGGTTACAAGCTAC
 ACACGTCCAAACCTTTCTAGTATAAACCATCCTCTCTATGATTTAGGGGCAGTTAGC
 ATGCGTATGTTGACTAAAATTATGCATAAGGAAGAAGCTTGAAGATAAAGACGTTAT
 TCTTAATCATGGTCTAACTTTACGCCAGTCAACAAAATAA

SEQ ID NO:71

ATGAATACTGATGAAACAATCACAATTTATGATGTAGCGCGTGAAGCTGGAG
 TATCGATGGCAACTGTTTCTCGTGTTGTAATGGTAACAAAAACGTAAGAAAAC
 ACCCGAAAAAAGTGCTCGAAGTCATTGATCGTTTGGATTACCGTCCAAATGCGGTTG
 CGCGTGGCTTGGCAAGTAAAAAACAACACTACTGTAGGAGTTGTCATTCCAAATATTG
 TAAATAGCTATTTTGCTACTCTAGCTAAAGGTATTGATGACATTGCAACCATGTATA
 AGTATAATATTGTTCTTGCTTCCAGTGATGATAATGAGGATCATGAAGTTACAGTCA
 TTCATTCTCTAATTTCTAAACAAGTTGATGGTATTATTTTTATGGGACACCATCTGAC
 AGAAAAAATCCGTGCAGAATTCTCTCGTACCCGTACACCGATTGTTCTAGCAGGAAC
 AGTTGATCTCGAACACCAATTACCAAGTGTTAACATCGACTATAAAGCTGCCGTTGA
 GGATTGTGTAACGCAACTTGCTAAAAATAATGAAAAGGTTGCCTTTGTATCAGGACC
 ACTAATTGATGATATTAATGGCAAACACTACGTTTGGCCGGGTATAAGTCTGGACTTGA
 AAAGAATAATTTGAGCTACAACGAAGGACTTGTCTTTGAAGCTAAATATAGCTATA
 AAGACGGCTTTGAGTTAGCACAACGTGTCTTGAACCTCTGGTGCCACTGCTGCCTATG
 TTGGGGAAGATGAATTGGCTGCAGGTCTCTTGAATGGCCTCTTTGCTGCAGGCAAAT
 CAGTTCCAGAAGATTTCGAAATCATCACAAGCAATGATTCACCGGTTACAAGCTACA
 CACGTCCAAACCTTTCTAGTATAAACCATCCTCTCTATGATTTAGGGGCAGTTAGCA
 TCGTATGTTGACTAAAATTATGCATAAGGAAGAAGCTTGAAGATAAAGACGTTATTC
 TTAATCATGGTCTAACTTTACGCCAGTCAACAAAATAA

SEQ ID NO:122

MGIGIIIASHGRFAEGIHQSGSMIFGDQEKVQVVTFMPSEGPDDLIAHFNNIAIQF
 DVDDEILVLADLWSGSPFNQASRIARENPRDKIAIITGLNLPMLIQAYTERMM DANATVE
 QVAANIKEAKGGIKALPEELNPAETTAAPVEAAPQGAIPETVIGDGKLNINLARLD
 TRLLHGQVVTNWVPYSKADRIIVASDDVAKDELKELIKQAAPNGIKVNVVPIQKLIDA
 SKDPRFGNTHALVLFETVQDALRAIEGGVPIKELNVGSMASHSTGKTMVNNVLSMDKDD

VACFEKLRDLGVEFDVRKVPNDSKKDLFELIKKANVQ

SEQ ID NO:155

ATGGGTATCGGTATTATTATTGCCAGCCATGGTAGGTTTCGCTGAAGGAATCC
 ACCAATCAGGCTCTATGATTTTTGGGGACCAAGAGAAAGTTCAAGTTGTGACTTTCA
 TGCCAAGTGAAGGTCCTGATGATTTGTACGCTCACTTCAACAACGCCATTGCACAAT
 TCGATGTTGATGATGAAATTCTTGTTTTGGCTGACCTTTGGAGTGGTTCACCATTAA
 CCAAGCTAGTCGAATCGCTAGGGAAAATCCAGATCGCAAGATTGCTATCATCACAG
 GACTTAACTTGCCAATGCTAATCCAAGCATACTGAACGTATGATGGATGCTAACG
 CTACTGTAGAGCAAGTTGCTGCTAATATCATCAAGGAAGCTAAGGGTGGTATCAAG
 GCACTTCCAGAAGAGCTAAATCCAGCTGAGGAAACAACCTGCAGCTCCTGTAGAAGC
 TGCAGCACCTCAAGGAGCTATCCCTGAAGGAACAGTCATCGGAGATGGTAAACTCA
 AGATTAACCTGGCACGTTTGGACACACGTCTCTTGCATGGTCAAGTAGTAACTAACT
 GGGTACCTTATTCTAAAGCAGACCGTATTATTGTTGCTTCGGATGACGTTGCCAAAG
 ATGAGCTTCGTAAGGAATTGATCAAACAGGCTGCACCAAACGGTATTAAGTAAAC
 GTTGTCCGATTCAAAAATTAATTGATGCTTCTAAAGACCCACGTTTTGGAAATACA
 CATGCGCTTGTCTTGTTCGAAACTGTTCAAGACGCACTTCGTGCTATCGAAGGTGGC
 GTGCCAATAAAAAGAACTAACGTTGGTTCTATGGCTCACTCAACTGGTAAAACAATG
 GTTAACAACGTTTTGTCTATGGATAAAGATGATGTTGCTTGTTTTGAAAAATTACGT
 GACCTTGGCGTTTAATTTGACGTCCGTAAGGTTCCAACGATTCTAAGAAAGATTTG
 TTTGAGCTTATCAAGAAAGCTAACGTTCAATAA

SEQ ID NO:156

MGIGIIIASHGRFAEGIHQSGSMIFGDQEKVQVVTFMPSEGPDDLIAHFNNIAIQF
 DVDDEILVLADLWSGSPFNQASRIARENPRDKIAIITGLNLPMLIQAYTERMMDANATVE
 QVAANIKEAKGGIKALPEELNPAETTAAPVEAAAPQGAIPETVIGDGKLNINLARLD
 TRLLHGQVVTNWVPYSKADRIIVASDDVAKDELKELIKQAAPNGIKVNVVPIQKLIDA
 SKDPRFGNTHALVLFETVQDALRAIEGGVPIKELNVGSMASHSTGKTMVNNVLSMDKDD
 VACFEKLRDLGV

SEQ ID NO:174

MSDMSIISAILVVAVAFVLAGLESILDQFQFHQPLVACTLIGAATGNLTAGIMLGG
 LQMITLAWANIGAAVAPDVALASVAAAIIIVKGGKFTAEGIGVAIAIAILLAVAGLFLTM
 PVRTASIAFVHAADKAAEHGNIAGVERAYYLALLLQGLRIAVPAALLLAIPAQSVQHAL
 GLMPDWLTHGLVVGGGMVVAVGYAMIINMMATREVPFFAIGFALAAISQLTLIALST
 IGVAIAFIYLNLSKQGGGNGGGNGGGTSSGSGDPIGDILEDY

SEQ ID NO:201

ATGTCAGATATGTCAATTATTTCTGCGATTTTGGTTCGTAGCTGTTGCCTTCCTT
 GCTGGTCTTGAAAGTATCCTTGACCAATTCCAATTCCACCAACCACTTGTTCATGT
 ACCCTCATCGGTGCTGCCACAGGTAACCTCACTGCAGGTATCATGCTTGGTGGTTCT
 CTTCAAATGATTACCCTTGCTTGGGCAAACATCGGTGCTGCCGTAGCTCCTGACGTT
 GCCCTTGCATCTGTTGCCGCTGCCATCATTTTGGTTAAAGGTGGTAAATTTACAGCTG
 AAGGTATCGGTGTTGCGATTGCAATAGCTATCCTGCTTGCAGTTGCAGGTCTCTTCCT

AACTATGCCTGTTTCGTACAGCATCTATTGCCTTTGTTTCATGCTGCAGATAAAGCTGC
 AGAACACGGAAACATCGCTGGTGTGAAACGTGCATACTACCTCGCTCTCCTTCTTCA
 AGGTTTGCATATTGCTGTGCCAGCAGCCCTTCTTCTTGCCATCCCGGCCCAATCTGTT
 CAACATGCCCTTGGCTTGATGCCTGACTGGCTCACCCATGGTTTGGTTGTCGGTGGT
 GGTATGGTCGTAGCCGTTGGTTACGCCATGATTATCAATATGATGGCTACTCGTTAA
 GTTTGGCCATTCTTCGCCATTGGTTTTGCTTTGGCAGCAATTAGCCAATTGACACTTA
 TCGCTCTTAGTACCATTGGTGTGCCATCGCCTTCATCTACCTCAACCTTTCTAAACA
 AGGTGGCGGAAATGGTGGCGGAAATGGTGGCGGAACTTCATCTGGTTCAGGCGACC
 CAATCGGCGATATCTTGAAGACTACTAG

SEQ ID NO:202

MSDMSIISAILVVAVAFFLAGLESILDQFQFHQPLVACTLIGAATGNLTAGIMLGG
 LQMITLAWANIGAAVAPDVALASVAAAIIIVKGGKFTAEGIGVAIAIAILLAVAGLFLTM
 PVRTASIAFVHAADKAAEHGNIAGVERAYYLALLLQGLRIAVPAALLLAIPAQSVQHAL
 GLMPDWLTHGLVVGGGMVVAVGYAMIINMMATR

SEQ ID NO:211

MAEKIQLSQADRKKVWVRSQFLQGAWNYERMQNLGWAYSILIPAIAKKLYTNKE
 DQAAALKRHLEFFNTHPYVAAPIIGVTLALEEEKANGTEIEDAAIQGVKIGMMGPLAGIG
 DPVFWFTIRPILGALGASLAQAGNIAGPLIFFIGWNLIRMAFLWYTQELGYKAGSEITKDI
 SGGILKDITKGASILGMFILAVLVERWVSVVFTVKLPGKVLPGAYIEWPKGYVTGDQL
 KTILGQVNDKLSFDKIQVDTLQKQLDSLIPGLTGLLLTFACMWLLKKKVSPITIIIGLFVV
 GIVASFF

GIM

SEQ ID NO:250

ATGGCTGAAAAAATTCAATTATCTCAAGCGGATCGTAAAAAAGGTTTGGTGG
 CGCTCACAATTCTTGCAAGGTGCATGGAACCTATGAACGTATGCAAACTTGGGTTGG
 GCTTACTCACTCATTCTGCTATCAAAAACTTTATACTAACAAGAGGACCAAGCC
 GCAGCTCTTAAACGTCACCTGGAATTCTTCAACACTCACCTTACGTAGCTGCTCCTA
 TCATAGGGGTTACCTTAGCTCTTGAAGAAGAAAAAGCTAATGGTACTGAAATCGAA
 GATGCGGCTATCCAAGGGGTTAAAATCGGTATGATGGGTCCACTTGCCGGTATCGGT
 GACCCTGTCTTCTGGTTCACAATTCGTCCAATTCTTGGTGCCTTGGTGCATCATTGG
 CACAAGCTGGTAACATTGCTGGTCCACTTATCTTCTTCATTGGTTGGAACCTTATCCG
 CATGGCCTTCTTGTGGTACACTCAAGAACTTGGTTACAAAGCAGGTTCAGAAATCAC
 TAAAGACATATCTGGTGGTATCTTGAAAGATATTACTAAAGGGGCATCAATACTTGG
 TATGTTTCATCTTGGCCGTCCTCGTTGAACGTTGGGTATCTGTCGTCTTCACTGTAAAG
 CTTCCAGGTAAAGTTTTGCCTAAAGGTGCTTATATTGAATGGCCAAAAGGATATGTT
 ACTGGTGACCAACTAAAACTATCCTTGGTCAAGTCAACGATAAGCTTAGCTTTGAT
 AAGATTCAAGTCGATACCCTACAAAAACAATTGGATTCAATTAATCCAGGTTTGACG
 GGACTTCTCCTTACTTTTGCATGTATGTGGTTGCTTAAGAAGAAAGTTTCACCAATCA
 CAATCATCATCGGACTCTTTGTAGTTGGTATTGTTGCAAGCTTCTTCGGAATCATGTA

A

SEQ ID NO:251

MAEKIQLSQADRKKGLVALTILARCMEL

ШТАММЫ

Номера DGCC являются внутренними ссылками на коллекцию DuPont Danisco; Цифрами DSM являются номера, присвоенные Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH (Inhoffenstr. 7B, D-38124 (Брауншвейг), после депонирования в соответствии с Будапештским договором.

Что касается штамма *Streptococcus thermophilus* DGCC7710, депонированного в соответствии с Будапештским договором в Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH, 14 января 2014 года под номером DSM28255, мы подтверждаем, что депонент, Danisco Deutschland GmbH (Busch-Johannsen-Strasse 1, D-25899 Niebüll, Germany) уполномочил заявителя (DuPont Nutrition Biosciences ApS) ссылаться на депонированный биологический материал в этой заявке. Выражения «штамм DGCC7710» и «производное DGCC7710» используются взаимозаменяемо с выражениями «штамм DSM28255» и «производное DSM28255».

Штамм *Streptococcus thermophilus*, депонированный в соответствии с Будапештским договором в Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH, 15 августа 2017 года под номером DSM32587, был депонирован компанией DuPont Nutrition Biosciences ApS.

Заявитель требует, чтобы образец депонированных микроорганизмов, указанных в настоящем документе, был доступен только эксперту до даты выдачи патента.

В отношении тех обозначений, в которых испрашивается европейский патент, образец этих депонированных микроорганизмов будет доступен до публикации упоминания о выдаче европейского патента или до даты, когда заявка была отклонена или отозвана или считается отозванной только путем выдачи такого образца эксперту, назначенному лицом, запрашивающим образец, и утвержденным либо i) заявителем, и/или ii) Европейским патентным ведомством, в зависимости от того, что применимо.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Pool et al.; 2006. *Metabolic Engineering* 8(5): 456-464

Porter et al.; 1982. *Biochim Biophys Acta* 709: 178-186

Sørensen et al.; 2016. *Appl Environ Microbiol* 82 (12): 3683-3692

Van den Bogaard et al. 2000. *Journal of Bacteriology*; 182: 5982-5989

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, несущий мутацию в одном или более генах, выбранных из группы, состоящей из гена *glcK*, гена *ссрА*, гена *lacZ* и гена *ptsH*, и необязательно несущий мутацию в гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-специфической PTS,

где отношение активности бета-галактозидазы в указанном штамме согласно анализу с помощью теста D к активности глюкокиназы в указанном штамме согласно анализу с помощью теста E составляет, по меньшей мере, 4×10^{-6} и необязательно менее чем 8×10^{-3} .

2. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по п.1, активность глюкокиназы которого в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю.

3. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по п.2, который мутирован в своем гене *glcK*, в частности, в открытой рамке считывания своего гена *glcK*.

4. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по п.2 или 3, отличающийся тем, что активность глюкокиназы в указанном штамме составляет от 300 до 1200 Ед/г или от 400 до 1000 Ед/г общего белкового экстракта согласно анализу с помощью теста А.

5. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по п.2 или 3, отличающийся тем, что активность глюкокиназы в указанном штамме составляет от 10 до 50% активности глюкокиназы штамма DGCC7710, депонированного в DSMZ под номером доступа DSM28255 от 14 января 2014 г., в частности, от 15 до 40% активности глюкокиназы штамма DGCC7710, где обе, активность глюкокиназы указанного штамма и активность глюкокиназы штамма DGCC7710 анализируются с помощью теста А.

6. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по любому из пп.3-5, отличающийся тем, что максимальная скорость прямой реакции (V_{max}) его глюкокиназы в указанном штамме значительно снижена, но не равна нулю и определяется одним или двумя из этих параметров:

- V_{max} глюкокиназы в указанном штамме составляет от 300 до 1200 Ед/г или от 400 до 1000 Ед/г общего белкового экстракта, согласно анализу с помощью теста С;

- V_{max} глюкокиназы в указанном штамме составляет от 10 до 50% от V_{max} глюкокиназы штамма DGCC7710, депонированного в DSMZ под номером доступа DSM28255 от 14 января 2014 г., при анализе обоих с помощью теста С, в частности, составляет от 15 до 40% V_{max} глюкокиназы DGCC7710.

7. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по любому из пп.3-6, отличающийся тем, что мутированный ген *glcK* кодирует глюкокиназу, выбранную из группы, состоящей из:

а) глюкокиназы, имеющей аминокислоту в своем положении 275, которая не

является глутаминовой кислотой, в частности не является кислой аминокислотой, в частности представляет собой лизин;

б) глюкокиназы, последовательность которой определена в SEQ ID NO: 25, где аминокислота в положении 275 указанной SEQ ID не является глутаминовой кислотой, в частности, не является кислой аминокислотой, в частности, представляет собой лизин;

с) глюкокиназы, последовательность которой имеет по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 25, в частности, имеет длину 322 аминокислоты, где аминокислота глюкокиназы, соответствующая положению 275 последовательности SEQ ID NO: 25 (или аминокислота в положении 275 указанной глюкокиназы), не является глутаминовой кислотой, в частности, не является кислой аминокислотой, в частности, представляет собой лизин;

д) глюкокиназы, имеющей аминокислоту в своем положении 144, которая не является глицином, в частности не является алифатической аминокислотой, в частности представляет собой серин;

е) глюкокиназы, последовательность которой определена в SEQ ID NO: 46, где аминокислота в положении 144 не является глицином, в частности не является алифатической аминокислотой, в частности представляет собой серин; или

ф) глюкокиназы, последовательность которой имеет по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 46, в частности, имеет длину 322 аминокислоты, где аминокислота указанной глюкокиназы, соответствующая положению 144 последовательности SEQ ID NO: 46 (или аминокислота в положении 144 указанной глюкокиназы), не является глицином, в частности, не является алифатической аминокислотой, в частности представляет собой серин.

8. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по любому из пп.3-7, который дополнительно мутирован в гене *ссрА*.

9. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по п.1, который мутирован в гене *ссрА*.

10. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по п.8 или 9, отличающийся тем, что ген *ссрА* несет мутацию, выбранную из группы, состоящей из бессмысловой мутации, расположенной между нуклеотидом 1 и нуклеотидом 270 кодирующей последовательности гена *ссрА*, и мутации, расположенной в первой четверти кодирующей последовательности гена *ссрА*, приводящей к сдвигу открытой рамки считывания гена *ссрА*.

11. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по п.10, отличающийся тем, что последовательность указанного мутированного гена *ссрА* выбрана из группы, состоящей из:

а) последовательности, определенной в SEQ ID NO: 71; и

б) вариантной последовательности *ссрА*, имеющей по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 71.

12. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus*

thermophilus по п.1, который мутирован в гене lacZ, кодирующем бета-галактозидазу, так что активность гидролиза лактозы указанной бета-галактозидазы увеличивается.

13. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по п.1, который мутирован в гене ptsH, кодирующем HPr.

14. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по любому из пп.2-13, который дополнительно мутирован в одном или более генах, в частности, в одном гене, кодирующем белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, в частности, в одном или более генов, в частности, одном гене, выбранном из группы, состоящей из гена manL, гена manM и гена manN.

15. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по п.14, отличающийся тем, что мутированный ген, кодирующий белок маннозо-глюкозо-специфической PTS, кодирует белок, активность импорта глюкозы которого снижена или отменена, в частности белок, выбранный из группы, состоящей из:

а) белка ПАВMan *Streptococcus thermophilus*, укороченного в положении 305 (ПАВMan305);

б) белка ПСMan *Streptococcus thermophilus*, укороченного в положении 208 (ПСMan208); и

с) белка IIDMan *Streptococcus thermophilus*, укороченного в положении 28 (IIDMan28).

16. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по п.14 или 15, отличающийся тем, что последовательность белка ПАВMan305 выбрана из группы, состоящей из:

а) последовательности, определенной в SEQ ID NO: 156; и

б) вариантной последовательности ПАВ, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 156, в частности, длиной 305 аминокислот;

отличающийся тем, что последовательность белка ПСMan208 выбрана из группы, состоящей из:

а) последовательности, определенной в SEQ ID NO: 202; и

б) вариантной последовательности ПСMan, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 202, в частности, длиной 208 аминокислот;

отличающийся тем, что последовательность белка IIDMan28 выбрана из группы, состоящей из:

а) последовательности, определенной в SEQ ID NO: 251; и

б) вариантной последовательности IIDMan, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 251, в частности, длиной 28 аминокислот.

17. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по любому из пп.1-16, отличающийся тем, что концентрация глюкозы в молоке, ферментированном указанным штаммом *Streptococcus thermophilus*, согласно анализу с помощью теста В, составляет по меньшей мере 8 мМ.

18. Лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus*

последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 250 (кодирующей PIDMan28); и

- их вариантов, которые демонстрируют отношение активности бета-галактозидазы согласно анализу с помощью теста D к активности глюкокиназы согласно анализу с помощью теста E, минимальное значение которого выбрано из группы, состоящей из по меньшей мере, 4×10^{-6} , по меньшей мере 5×10^{-6} , по меньшей мере 6×10^{-6} , по меньшей мере 7×10^{-6} и по меньшей мере 8×10^{-6} , и, необязательно, максимальное значение отношения составляет менее чем 8×10^{-3} .

19. Композиция, содержащая по меньшей мере один, в частности, один лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по любому из пп.1-18, в частности, в комбинации с другими молочнокислыми бактериями, в частности, с одним или более штаммами, выбранными из группы, состоящей из штамма рода *Lactobacillus*, такого как штамм *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*, штамма рода *Lactococcus*, такого как штамм *Lactococcus lactis*, или штамма рода *Bifidobacterium*.

20. Способ производства ферментированного молочного продукта, в частности, ферментированного молока, включающий инокуляцию субстрата молока лактозо-положительным, галактозо-отрицательным штаммом *Streptococcus thermophilus* по любому из пп.1-18 или композицией по п.19, и ферментация указанного инокулированного молока для получения ферментированного молочного продукта.

21. Применение лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus* по любому из пп.1-18 или композиции по п.19 для получения ферментированного молочного продукта.

22. Ферментированный молочный продукт, содержащий по меньшей мере один, в частности, один лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus* по любому из пп.1-18 или полученный способом по п.20.

23. Глюкокиназа *Streptococcus thermophilus*, чья активность значительно снижена, но не равна нулю в производном DGCC7710, как определено следующим:

а) активность глюкокиназы указанной глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* в производном DGCC7710 составляет либо от 300 до 1200 Ед/г, либо от 400 до 1000 Ед/г общего белкового экстракта согласно анализу с помощью теста А, или

б) активность глюкокиназы указанной глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* в производном DGCC7710 составляет от 10 до 50% активности глюкокиназы штамма DGCC7710, депонированного в DSMZ под номером доступа DSM28255 14 января 2014г., когда оба анализируются с помощью теста А, в частности, от 15 до 40% активности глюкокиназы штамма DGCC7710, где активность глюкокиназы в указанном производном DGCC7710 и активность глюкокиназы штамма DGCC7710 анализируются тестом А.

24. Глюкокиназа по п.23, отличающаяся тем, что она имеет «значительно сниженную, но не равную нулю» максимальную скорость прямой реакции (V_{max}) в производном DGCC7710, как определено одним или двумя из этих параметров:

а) V_{max} указанной глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* в производном DGCC7710 составляет от 300 до 1200 Ед/г или от 400 до 1000 Ед/г общего белкового

экстракта, согласно анализу с помощью теста С;

б) V_{max} указанной глюкокиназы *Streptococcus thermophilus* в производном DGCC7710, которая составляет от 10 до 50% V_{max} глюкокиназы штамма DGCC7710, депонированного в DSMZ под номером доступа DSM28255 14 января 2014г., когда их обе анализировали с помощью теста С, в частности, от 15 до 40% V_{max} глюкокиназы DGCC7710.

25. Глюкокиназа *Streptococcus thermophilus* по п.23 или 24, выбранная из группы, состоящей из:

а) глюкокиназы, имеющей аминокислоту в положении 275, которая не является глутаминовой кислотой, в частности, которая не является кислой аминокислотой, в частности, представляет собой лизин,

б) глюкокиназы, имеющей аминокислоту в положении 275, которая не является глутаминовой кислотой, в частности, которая не является кислой аминокислотой, в частности представляет собой лизин, и имеет аргинин в положении 278 и/или серин в положении 279; и

с) глюкокиназы, имеющей в аминокислоту своем положении 144, которая не является глицином, в частности, которая не является алифатической аминокислотой, в частности, представляет собой серин.

26. Глюкокиназа по любому из пп.23-25, последовательность которой выбрана из группы, состоящей из:

а) последовательности, как определено в SEQ ID NO: 25, где аминокислота в положении 275 указанной SEQ ID не является глутаминовой кислотой, в частности, не является кислой аминокислотой, в частности, представляет собой лизин; и

б) вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 25, где аминокислота указанной глюкокиназы соответствует положению 275 последовательности SEQ ID NO: 25 (или аминокислота в положении 275 указанной глюкокиназы) не является глутаминовой кислотой, в частности, не является кислой аминокислотой, в частности, представляет собой лизин;

с) последовательности, как определено в SEQ ID NO: 46, где аминокислота в положении 144 не является глицином, в частности, не является алифатической аминокислотой, в частности, представляет собой серин; и

д) вариантной последовательности GlcK, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 46, где аминокислота указанной глюкокиназы, соответствующая положению 144 последовательности SEQ ID NO: 46 (или аминокислота в положении 144 указанной глюкокиназы), не является глицином, в частности, не является алифатической аминокислотой, в частности, представляет собой серин.

27. Полинуклеотид, кодирующий глюкокиназу *Streptococcus thermophilus* любому из пп.23-26.

28. Полинуклеотид *sspA Streptococcus thermophilus*, выбранный из группы, состоящей из:

а) полинуклеотида *срА*, который при вставке вместо гена *срА* штамма DGCC7710, приводит к производному DGCC7710, демонстрирующему отношение активности бета-галактозидазы согласно анализу с помощью теста D к активности глюкокиназы согласно анализу с помощью теста E, составляющее по меньшей мере, 4×10^{-6} ; и

б) полинуклеотида *срА*, который при вставке вместо гена *срА* штамма DSM32587 приводит к производному DSM32587:

- демонстрирующему отношение активности бета-галактозидазы согласно анализу с помощью теста D к активности глюкокиназы согласно анализу с помощью теста E, составляющее по меньшей мере, 4×10^{-6} ; и

- высвобождающему глюкозу в концентрации согласно анализу с помощью теста B, которая составляет, по меньшей мере, 50 мМ, или высвобождающему глюкозу в концентрации, которая увеличивается, по меньшей мере, на 150% или, по меньшей мере, на 200% по сравнению с концентрацией глюкозы, высвобождаемой штаммом DSM32587, когда они оба оцениваются с помощью теста B.

29. Полинуклеотид *срА* *Streptococcus thermophilus* по п.28, несущий мутацию, выбранную из группы, состоящей из несмысловой мутации, расположенной между нуклеотидом 1 и нуклеотидом 270 кодирующей последовательности гена *срА*, и мутацию, расположенную в первой четверти кодирующей последовательности гена *срА*, приводящую к сдвигу открытой рамки считывания гена *срА*, в частности, полинуклеотид, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из а) последовательности, как определено в SEQ ID NO: 71; и б) вариантной последовательности *срА*, имеющей по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 71.

30. Применение полинуклеотида по п.27 и/или полинуклеотида по п.28 или 29 для создания штамма *Streptococcus thermophilus*.

31. Применение мутированного гена *manL*, гена *manM* или гена *manN* *Streptococcus thermophilus*, кодирующего, соответственно, белок ПАВMan, белок ПСMan или белок ПDMan, где активность импорта глюкозы указанного белка снижается или отменяется, для замены, соответственно, соответствующего гена *manL*, гена *manM* или гена *manN* лактозо-положительного, галактозо-отрицательного штамма *Streptococcus thermophilus*, демонстрирующего отношение активности бета-галактозидазы согласно анализу с помощью теста D к активности глюкокиназы согласно анализу с помощью теста E, составляющее по меньшей мере 4×10^{-6} .

32. Применение по п.31, отличающееся тем, что указанный лактозо-положительный, галактозо-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*, демонстрирующий отношение активности бета-галактозидазы согласно анализу с помощью теста D к активности глюкокиназы согласно анализу с помощью теста E, составляющее по меньшей мере 4×10^{-6} , является любым из штаммов, как определено в пп.2-13.

33. Применение по п.31 или 32, отличающееся тем, что указанный мутированный ген *manL*, ген *manM* или ген *manN* *Streptococcus thermophilus* характеризуется тем, что:

а) при индивидуальной вставке вместо гена *manL*, гена *manM* или гена *manN* штамма DSM32587 производное DSM32587:

- демонстрирует отношение активности бета-галактозидазы согласно анализу с помощью теста D к активности глюкокиназы согласно анализу с помощью теста E, составляющее по меньшей мере, 4×10^{-6} ; и

- высвобождает глюкозу в концентрации, которая увеличивается, по меньшей мере, на 150% или, по меньшей мере, на 200% по сравнению с концентрацией глюкозы, высвобождаемой штаммом DSM32587, при анализе обоих с помощью теста B; или

б) при индивидуальной вставке вместо гена *manL*, гена *manM* или гена *manN* штамма DGCC7710, в котором ген *ссрА* ранее был заменен геном *ссрА*, как определено в SEQ ID NO: 71 (то есть из штамма DGCC7710-*ссрА*Δ1A114-120), производное DGCC7710-*ссрА*Δ1A114-120:

- демонстрирует отношение активности бета-галактозидазы согласно анализу с помощью теста D к активности глюкокиназы согласно анализу с помощью теста E, составляющее по меньшей мере, 4×10^{-6} ; и

- высвобождает глюкозу в концентрации, которая увеличивается, по меньшей мере, на 150% или, по меньшей мере, на 200% по сравнению с концентрацией глюкозы, высвобождаемой штаммом DGCC7710-*ссрА*Δ1A114-120, при анализе обоих с помощью теста B.

34. Применение по любому из пп.31-33, отличающееся тем, что указанный мутированный ген *manL* *Streptococcus thermophilus* кодирует белок ПАВMan *Streptococcus thermophilus*, укороченный в положении 305 (ПАВMan305), в частности, для укороченного белка ПАВMan305, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из а) последовательности, как определено в SEQ ID NO: 156, и б) вариантной последовательности ПАВMan, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 156, в частности, длиной 305 аминокислот.

35. Применение по любому из пп.31-33, отличающееся тем, что указанный мутированный ген *manM* *Streptococcus thermophilus* кодирует белок ПСMan *Streptococcus thermophilus*, укороченный в положении 208 (ПСMan208), в частности, для укороченного белка ПСMan, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из а) последовательности, как определено в SEQ ID NO: 202, и б) вариантной последовательности ПСMan, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 202, в частности, длиной 208 аминокислот.

36. Применение по любому из пп.31-33, отличающееся тем, что указанный мутированный ген *manN* *Streptococcus thermophilus* кодирует белок IIDMan *Streptococcus thermophilus*, укороченный в положении 28 (IIDMan28), в частности, для укороченного белка IIDMan, последовательность которого выбрана из группы, состоящей из а) последовательности, как определено в SEQ ID NO: 251; и б) вариантной

последовательности PDMan, имеющей по меньшей мере 90% сходства или идентичности с SEQ ID NO: 251, в частности, длиной 28 аминокислот.

37. Применение по любому из пп.31-36, отличающееся тем, что указанный мутированный ген manL, ген manM или ген manN *Streptococcus thermophilus* выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 155X, SEQ ID NO: 201 и SEQ ID NO: 250.

По доверенности

ФИГ.1

DGCC7710 MSKLLGIDLGGTTVKFGILTADGEVQEKWAIETNTFENGSHIVPDIVESLKHRLELYG
 DSM32587 MSKLLGIDLGGTTVKFGILTADGEVQEKWAIETNTFENGSHIVPDIVESLKHRLELYG
 ST1m-*glcK0*-gal+ MSKLLGIDLGGTTVKFGILTADGEVQEKWAIETNTFENGSHIVPDIVESLKHRLELYG

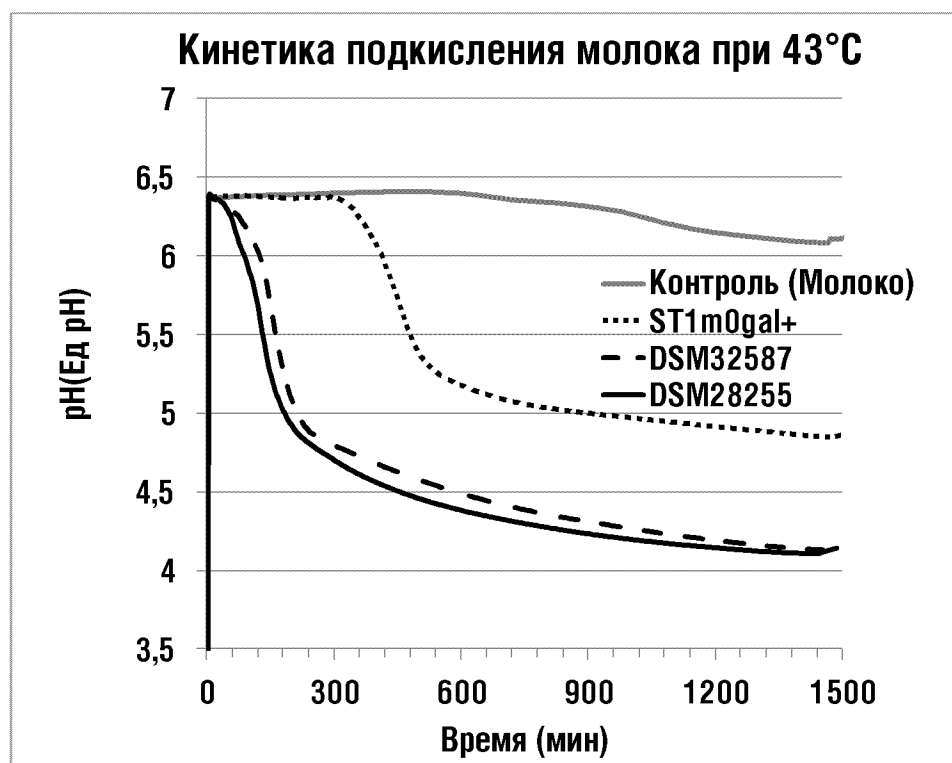
LTAEDFIGIGMGSPGAVDRENKTVTGFNLNWAETQEVGSVIEKELGIPFAIDNDANVAALGERWVGAGAN
 LTAEDFIGIGMGSPGAVDRENKTVTGFNLNWAETQEVGSVIEKELGIPFAIDNDANVAALGERWVGAGAN
 LTAEDFIGIGMGSPGAVDRENKTVTGFNLNWAETQEVGSVIEKELGIPFAIDNDANVAALGERWVGAGAN

NRNVVFITLGTGVGGGVIADGNLIHGAVAGGGEIGHIIVEPDTGFECTCGNKGCLETVASATGIVRVAHH
 NRNVVFITLGTGVGGGVIADGNLIHGAVAGGGEIGHIIVEPDTGFECTCGNKGCLETVASATGIVRVAHH
 NRNVVFITLGTGVGGGVIADGNLIHGAVAGGGEIGHIIVEPDTGFECTCGNKGCLETVASATGIVRVAHH

LAEKYE GNSSIKA AVDNGE FVTSKDI IVAATEGDKFADSI VDKVSKYLGLATANISNI LNPDSVVI GGGV
 LAEKYE GNSSIKA AVDNGE FVTSKDI IVAATEGDKFADSI VDKVSKYLGLATANISNI LNPDSVVI GGGV
 LAEKYE GNSSIKA AVDNGE FVTSKDI IVAATEGDKFADSI VDKVSKYLGLATANISNI LNPDSVVI GGGV

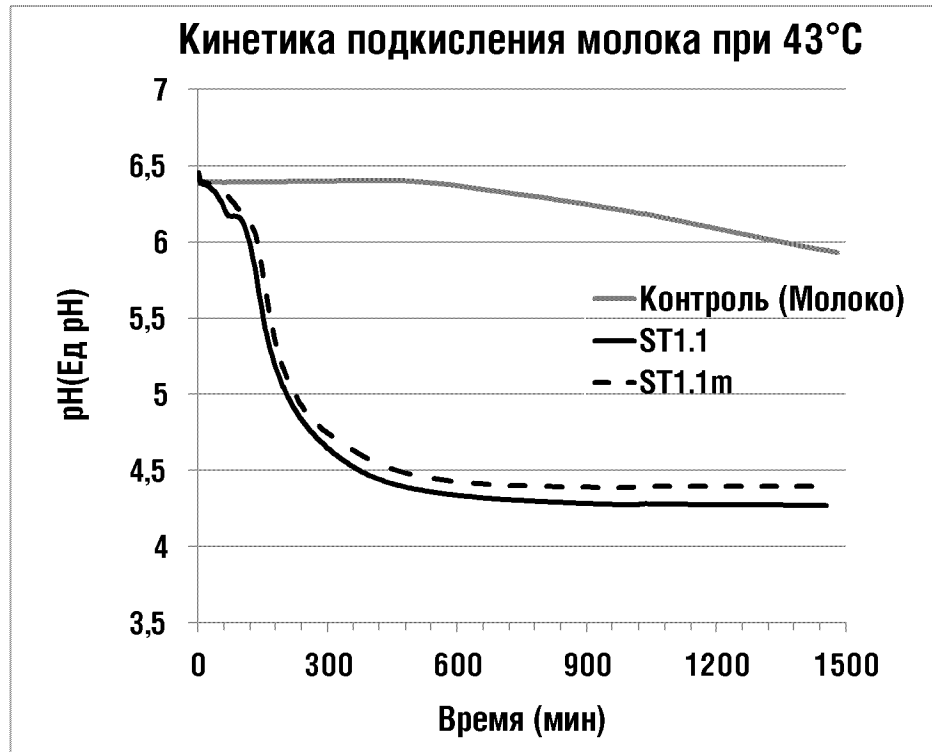
SAAGEFLRSRVEGYFTRYAFPQVRRTTKVKLAE LGNDAGIIGAASLAYSIDK
 SAAGEFLRSRVEGYFTRYAFPQVRRTTKVKLAE LGNDAGIIGAASLAYSIDK
 SAAGEFLRSRVEGYFTRYAFPQVRRTTKVKLAE LGNDAGIIGAASLAYSIDK

ФИГ.2

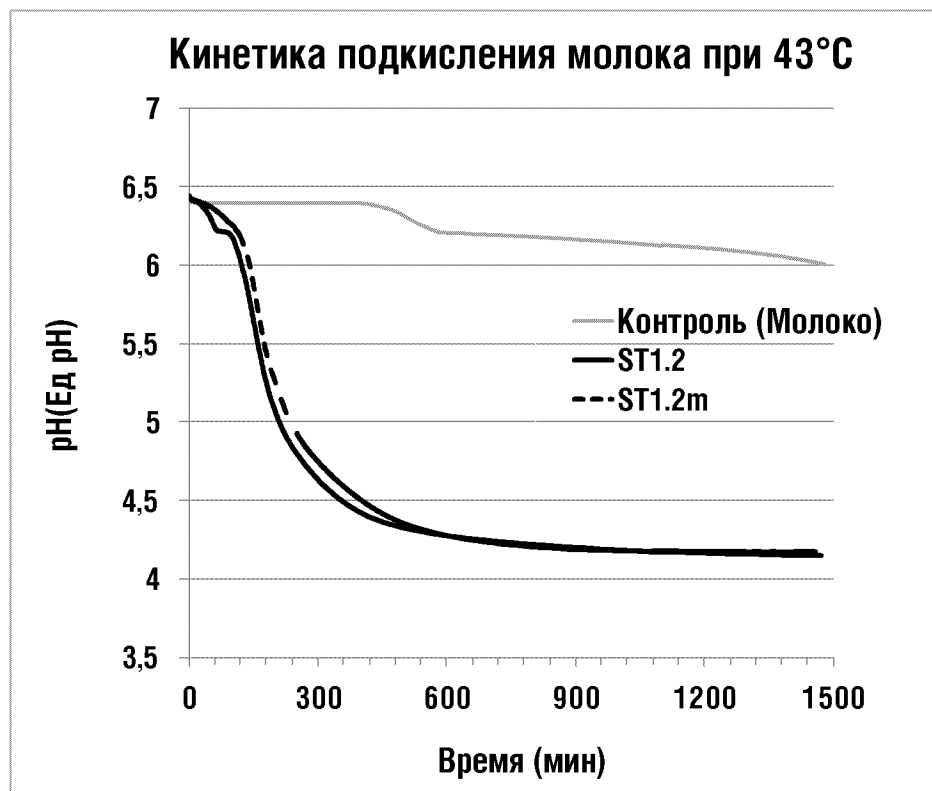


ФИГ.3

А.



В.



ФИГ.4

