(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 329 470**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/31 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04720033 .2**
(96) Fecha de presentación : **12.03.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1604025**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **14.12.2005**

(54) Título: **Bacterias lácticas texturantes.**

(30) Prioridad: **17.03.2003 FR 03 03242**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.11.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.11.2009

(73) Titular/es: **DANISCO A/S**
Langebrogade 1
1411 Copenhagen K., DK

(72) Inventor/es: **Horvath, Philippe;**
Manoury, Elise;
Huppert, Sonia y
Fremaux, Christophe

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 329 470 T3

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

DESCRIPCIÓN

Bacterias lácticas texturantes.

La presente invención se refiere a cepas de bacterias lácticas que comprenden al menos una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las secuencias de nucleótidos SEC ID Nº 1, SEC ID Nº 2, SEC ID Nº 3, SEC ID Nº 4, SEC ID Nº 5, SEC ID Nº 6, SEC ID Nº 7, SEC ID Nº 8, así como a un procedimiento de construcción de estas cepas. Por último la invención se refiere a productos alimenticios que comprenden y/o se elaboran con dichas cepas.

La industria alimentaria utiliza numerosas bacterias, especialmente en forma de fermentos, en particular bacterias lácticas, para mejorar el sabor y la textura de los alimentos pero también para alargar la vida útil de conservación de estos alimentos. En el caso de la industria láctea, las bacterias lácticas se utilizan ampliamente para provocar la acidificación de la leche (por fermentación) pero también para dar textura al producto en el que están incorporadas.

Entre las bacterias lácticas utilizadas en la industria alimentaria, se pueden citar los géneros *Streptococcus, Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus y Bifidobacterium*.

Las bacterias lácticas de la especie *Streptococcus thermophilus* se utilizan de manera extensiva solas o en combinación con otras bacterias para la fabricación de productos alimenticios, especialmente productos fermentados. Se introducen en particular en la formulación de fermentos utilizados para la fabricación de leches fermentadas, por ejemplo yogures. Entre ellas algunas juegan un papel preponderante en la elaboración de la textura del producto fermentado. Esta particularidad está estrechamente relacionada con la producción de polisacáridos. Entre las cepas de *Streptococcus thermophilus* pueden distinguirse cepas texturantes y cepas no texturantes.

Se entiende por cepa de *Streptococcus thermophilus* texturante una cepa que produce leches fermentadas que tienen, en las condiciones descritas en el ejemplo, una viscosidad superior a aproximadamente 35 Pa.s, un *área* de tixotropía inferior a aproximadamente 2000 Pa/s y un umbral de flujo inferior a aproximadamente 14 Pa. Una cepa de *Streptococcus thermophilus* puede definirse como muy texturante porque produce leches fermentadas que tienen, en las condiciones descritas en el ejemplo, una viscosidad superior a aproximadamente 50 Pa.s, un área de tixotropía inferior a aproximadamente 1000 Pa/s y una umbral de flujo inferior a aproximadamente 10 Pa.

Para responder a las exigencias industriales, se ha hecho necesario proponer nuevas cepas de bacterias lácticas texturantes, especialmente de *Streptococcus thermophilus*.

Asimismo la invención propone resolver el problema de proporcionar una cepa de bacteria láctica que tenga buenas propiedades de texturación para los productos alimenticios.

Para ello la invención propone una cepa de bacteria láctica que comprende al menos una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las secuencias de nucleótidos SEC ID Nº 1, SEC ID Nº 2, SEC ID Nº 3, SEC ID Nº 4, SEC ID Nº 5, SEC ID Nº 6, SEC ID Nº 7, SEC ID Nº 8.

La invención propone también una nueva cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada el 26 de febrero del 2003 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos con el número I-2980.

La invención se refiere también a las secuencias de nucleótidos SEC ID Nº 1, SEC ID Nº 2, SEC ID Nº 3, SEC ID Nº 4, SEC ID Nº 5, SEC ID Nº 6, SEC ID Nº 7, SEC ID Nº 8, así como a un ácido nucleico que comprende al menos una de estas secuencias de nucleótidos.

La invención se refiere también a plásmidos, vectores de clonación y/o de expresión que comprenden al menos una de las secuencias de nucleótidos SEC ID Nº 1, SEC ID Nº 2, SEC ID Nº 3, SEC ID Nº 4, SEC ID Nº 5, SEC ID Nº 6, SEC ID Nº 7, SEC ID Nº 8, así como un ácido nucleico que comprende al menos una de estas secuencias de nucleótidos.

La invención se amplia también a bacterias hospedadoras transformadas por los plásmidos o los vectores descritos anteriormente.

La invención se refiere también al procedimiento de construcción de las cepas descritas anteriormente *caracterizadas porque* esas cepas se obtienen por transformación usando un plásmido o un vector que comprende al menos una de las secuencias de nucleótidos SEC ID Nº 1, SEC ID Nº 2, SEC ID Nº 3, SEC ID Nº 4, SEC ID Nº 5, SEC ID Nº 6, SEC ID Nº 7, SEC ID Nº 8, o un vector que comprende un ácido nucleico que comprende al menos una de estas secuencias de nucleótidos.

La invención propone también composiciones bacterianas que comprenden al menos una cepa descrita anteriormente o que comprende al menos una cepa obtenida de acuerdo con el procedimiento de la invención.

Finalmente, la invención se refiere a una composición alimenticia o farmacéutica que comprende al menos una cepa de acuerdo con la invención o al menos una cepa obtenida de acuerdo con el procedimiento de la invención o la composición bacteriana de acuerdo con la invención.

La presente invención posee numerosas ventajas en términos de proporcionar textura a los medios en los que se incorpora. Especialmente permite obtener geles, a partir por ejemplo de leches fermentadas, que son espesos, adherentes, consistentes, fibrosos y resistentes a la mezcla y que no son granulosos.

Otras ventajas y características de la invención serán evidentes al leer la descripción y los ejemplos proporcionados a modo puramente ilustrativo y no limitantes que se indican más adelante.

La invención se refiere en primer lugar a una cepa bacteriana láctica que comprende al menos una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las secuencias de nucleótidos SEC ID Nº 1, SEC ID Nº 2, SEC ID Nº 3, SEC ID Nº 4, SEC ID Nº 5, SEC ID Nº 6, SEC ID Nº 7, SEC ID Nº 8.

Las bacterias lácticas son procariotas, gram positivas que pertenecen al grupo taxonómico Firmicutes. Son heterótrofas y quimiorganotrofas; generalmente anaerobias o aerotolerantes, su metabolismo puede ser homo- o heterofermentario: las bacterias lácticas producen esencialmente ácido láctico por fermentación de un sustrato glucídico. Desprovistas de catalasa, las bacterias lácticas constituyen un grupo heterogéneo de bacterias en forma coco para los géneros *Aerococcus, Enterococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* y *Weissella*, o en forma de bastoncillo para los géneros *Lactobacillus* y *Carnobacterium.* La denominación de bacteria láctica a menudo se extiende a otras bacterias relacionadas, tales como *Bifidobacterium.*

Entre las cepas de bacterias lácticas que son apropiadas para la presente invención se pueden citar los géneros *Streptococcus, Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* y *Bifidobacterium.*

La cepa de bacteria láctica preferida de acuerdo con la invención es *Streptococcus thermophilus.*

Streptococcus thermophilus es una especie presente en la leche de manera natural y ampliamente utilizada en la industria alimentaria, y especialmente láctea ya que permite acidificar y texturizar la leche. Es una bacteria termófila homofermentaria.

La invención se refiere después a la cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada el 26 de febrero del 2003 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos con el número 1-2980.

La invención también se refiere a las secuencias de nucleótidos de las SEC ID Nº 1, SEC ID Nº 2, SEC ID Nº 3, SEC ID Nº 4, SEC ID Nº 5, SEC ID Nº 6, SEC ID Nº 7, SEC ID Nº 8.

Las secuencias de nucleótidos SEC ID Nº 2 a SEC ID Nº 8 son parte de un operón de aproximadamente 14350 pares de bases implicado en la síntesis de polisacáridos (PS). Este operón está incluido en la secuencia SEC ID Nº 1. Esto significa que de acuerdo con la invención las secuencias SEC ID Nº 2 a SEC ID Nº 8 están incluidas en la secuencia SEC ID Nº 1.

De acuerdo con la invención, la estructura del operón se ha determinado (ver figura 1). Entre los genes *deoD* (cadena arriba del operón de PS) y *orf14.9* (cadena abajo), se han identificado 17 ORF (fase de lectura abierta en inglés, o marco abierto de lectura) denominados *eps13A, eps13B, eps13C, eps13D, eps13E, eps13F, eps13G, eps13H, eps13t, eps13J, eps13K, eps13L, eps13M, eps13N, eps13O, eps13P* e *IS1193*. Los 16 primeros ORF situados sobre la cadena "con sentido" codifican potencialmente polipéptidos implicados en la producción de polisacáridos exocelulares o capsulares; el 17º ORF situado sobre la cadena "antisentido" codifica potencialmente una transposasa funcional que pertenece a la familia *IS1193* (secuencia de inserción).

Es posible denominar y posicionar cada ORF. A continuación se indica la denominación de cada ORF, en segundo lugar la supuesta función de dicha proteína y finalmente en tercer lugar la posición de la región que comprende este ORF (con respecto a la secuencia SEC ID Nº 1 como se indica en la lista de secuencias):

- *eps13A*: Regulador transcripcional (342..1802)

- *eps13B*: Polimerización (regulación de la longitud de cadenas) y/o exportación de polisacáridos (1803..2534)

- *eps13C*: Polimerización (regulación de la longitud de cadenas) y/o exportación de polisacáridos (2543..3235)

- *eps13D*: Polimerización (regulación de la longitud de cadenas) y/o exportación de polisacáridos (3245..3985)

- *eps13E*: Undecaprenil-fosfato glicosiltransferasa (4042..5409)

- *eps13F*: Undecaprenil-fosfato glicosiltransferasa (5611..6195)

- *eps13G*: Undecaprenil-fosfato glicosiltransferasa (6251..6634)

- *eps13H*: Beta-1,4-galactosiltransferasa (6643..7092)

- *eps13I*: Beta-1,4-galactosiltransferasa (7092..7607)

- *eps13J*: Rhamnosiltransferasa (7597..8493)

- *eps13K*: Glicosiltransferasa (8763..9797)

- *eps13L*: Polimerasa de unidad repetitiva (9827..10969)

- *eps13M*: Polimerasa de unidad repetitiva (10984..11793)

- *eps13N*: Glicosiltransferasa (11844..12578)

- *eps130*: Glicosiltransferasa (12633..13016)

- *eps13P*: Transportador transmembrana (13049..14482)

- *IS1193*: Transposasa (complemento (14614..15870)).

La invención también se refiere a un ácido nucleico que comprende al menos una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las secuencias de nucleótidos SEC ID Nº 1, SEC ID Nº 2, SEC ID Nº 3, SEC ID Nº 4, SEC ID Nº 5, SEC ID Nº 6, SEC ID Nº 7, SEC ID Nº 8. Por ácido nucleico que comprende al menos una de las secuencias enumeradas anteriormente, se entiende en el sentido de la invención los ácidos nucleicos que comprenden al menos un ORF donde el producto de traducción posee una similitud de secuencia importante (porcentaje de restos idénticos superior o igual al 80%, después del alineamiento de secuencias para una correspondencia máxima entre las posiciones de los restos) con al menos una de las secuencias polipeptídicas deducidas de los ORF identificados en las secuencias SEC ID Nº 1 a SEC ID Nº 8.

Las secuencias de nucleótidos SEC ID Nº 1, SEC ID Nº 2, SEC ID Nº 3, SEC ID Nº 4, SEC ID Nº 5, SEC ID Nº 6, SEC ID Nº 7, SEC ID Nº 8 pueden insertarse en un vector por ingeniería genética, especialmente por técnicas de ADN recombinante ampliamente conocidas por los especialistas en la técnica.

La invención se refiere igualmente a un vector de clonación y/o de expresión que comprende al menos una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las secuencias de nucleótidos SEC ID Nº 1, SEC ID Nº 2, SEC ID Nº 3, SEC ID Nº 4, SEC ID Nº 5, SEC ID Nº 6, SEC ID Nº 7, SEC ID Nº 8 o un ácido nucleico como se define a continuación.

El vector preferido de acuerdo con la invención es un plásmido. Puede tratarse de un plásmido replicativo o integrativo.

A partir de estos vectores y/o plásmidos es posible transformar una bacteria para incluir en ella estos vectores y/o plásmidos. Esta transformación puede realizarse mediante la técnica de electroporación o por conjugación, y de un manera convencional para el especialista en la técnica.

La invención también se refiere a bacterias hospedadoras transformadas por un plásmido o un vector como se ha defino anteriormente.

Las bacterias transformadas son preferentemente bacterias lácticas. En particular una bacteria láctica que puede escogerse entre los géneros *Streptococcus, Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pe-diococcus* y *Bifidobacterium.*

La cepa de bacteria láctica preferida de acuerdo con la invención es *Streptococcus thermophilus.*

La invención también se refiere a un procedimiento de construcción de una cepa o de una bacteria hospedadora transformada de acuerdo con la invención *caracterizada porque* se obtiene por transformación usando un vector que comprende al menos una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las secuencias de nucleótidos SEC ID Nº 1, SEC ID Nº 2, SEC ID Nº 3, SEC ID Nº 4, SEC ID Nº 5, SEC ID Nº 6, SEC ID Nº 7, SEC ID Nº 8 o un ácido nucleico que comprende al menos una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las secuencias de nucleótidos SEC ID Nº 1, SEC ID Nº 2, SEC ID Nº 3, SEC ID Nº 4, SEC ID Nº 5, SEC ID Nº 6, SEC ID Nº 7, SEC ID Nº 8.

De acuerdo con el procedimiento de la invención, el vector preferido es un plásmido.

Ventajosamente de acuerdo con el procedimiento de la invención la transformación se produce después de una inserción en el genoma de la cepa o de la bacteria hospedadora transformada por al menos un evento de recombinación.

La invención también se refiere a una composición bacteriana que comprende al menos una cepa de acuerdo con la invención o que comprende al menos una cepa obtenida de acuerdo con el procedimiento de la invención o que comprende al menos una bacteria transformada de acuerdo con la invención.

Por composición bacteriana se entiende una mezcla de diferentes cepas, especialmente un fermento o una levadura.

Las mezclas de cepas preferidas de acuerdo con la invención son mezclas de *Streptococcus thermophilus* con otras *Streptococcus thermophilus,* o mezclas de *Streptococcus thermophilus* con *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus,* o mezclas de *Streptococcus thermophilus* con otros *Lactobacillus* y/o con *Bifidobacterium, o* mezclas de *Streptococcus thermophilus* con *Lactococcus,* o mezclas de *Streptococcus thermophilus* con otras cepas de bacterias lácticas y/o levaduras.

La invención también se refiere a la utilización de una cepa de acuerdo con la invención o una cepa obtenida de acuerdo con el procedimiento de la invención o de la composición bacteriana de acuerdo con la invención para elaborar un producto alimenticio o un ingrediente alimenticio.

Como producto alimenticio o ingrediente alimenticio preferido de acuerdo con la invención puede citarse un producto lácteo, un producto cárnico, un producto cerealista, una bebida, una espuma o un polvo.

Del mismo modo la invención se refiere a una composición alimenticia o farmacéutica que comprende al menos una cepa de acuerdo con la invención o al menos una cepa obtenida según el procedimiento de la invención o la composición bacteriana de acuerdo con la invención.

La invención también tiene como objeto un producto lácteo que comprende al menos una cepa de acuerdo con la invención o al menos una cepa obtenida de acuerdo con el procedimiento de la invención o la composición bacteriana de acuerdo con la invención.

En el caso de la elaboración de un producto lácteo, ésta se realizará de la manera habitual en este campo, y especialmente por fermentación de un producto lácteo incorporando una cepa de acuerdo con la invención.

Como producto lácteo de acuerdo con la invención, puede citarse una leche fermentada, un yogurt, una crema madura, un queso, queso fresco, una bebida láctea, un producto lácteo retenido, queso fundido, crema de repostería, requesón o leche infantil.

De preferencia, de acuerdo con la invención el producto lácteo comprende leche de origen animal y/o vegetal.

Como leche de origen animal puede citarse la leche de vaca, de oveja, de cabra o de búfala.

Como leche de origen vegetal puede citarse toda sustancia fermentable de origen vegetal que puede utilizarse de acuerdo con la invención que proviene especialmente del grano de soja, arroz o malta.

La figura 1 representa la estructura genética del operón de PS de la cepa de acuerdo con la invención comparado con el operón de PS de otras cepas de *Streptococcus thermophilus* ya conocidas.

La figura 2 representa el plano factorial 1-2 del análisis de componentes principales (ACP) obtenido a partir de datos sensoriales sobre leches fermentadas obtenidas con las diferentes cepas el estudio.

La figura 3 representa los promedios de las puntuaciones obtenidas sobre las descripciones de TEXTURA EN LA CUCHARA para cada una de las cepas del estudio. Interpretación de resultados del ensayo de Newman-Keuls: la diferencia entre las cepas relacionadas por una misma letra no es significativa.

La figura 4 representa los promedios de las puntuaciones obtenidas sobre las descripciones de TEXTURA EN LA BOCA para cada una de las fuentes del estudio. Interpretación de resultados del ensayo de Newman-Keuls: la diferencia entre las cepas relacionadas por una misma letra no es significativa.

A continuación se describen ejemplos concretos pero no limitantes de la invención.

Ejemplos

1/ *Secuenciación del operón de PS de Streptococcus thermophilus CNCM I-2980*

El fragmento de ADN que lleva el operón de PS de la cepa *Streptococcus thermophilus* CNCM I-2980 se ha obtenido por amplificación mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa, en inglés) a partir del ADN genómico extraído de dicha cepa. La amplificación se realizó con el termociclador Mastercycler (Eppendorf) utilizando la ADN polimerasa LA-*Taq* (BioWhittaker/Cambrex) y los siguientes cebadores: 5'-GGGTGAACGTATCTCAGTAATGGG GACTGG-3' y 5'-CCTGAGTTATGGGACGATTACTTGGCTG-3'. Las condiciones experimentales de esta amplificación son las siguientes: 14 ciclos de desnaturalización alternantes a 98ºC durante 30 segundos e hibridación-elongación a 68ºC durante 15 min., seguido de 16 ciclos de desnaturalización alternantes a 98ºC durante 30 segundos e hibridación-elongación a 68ºC durante 15 minutos con un aumento de 15 s por ciclo, y después un ciclo adicional de elongación a 72ºC durante 10 min. El producto PCR se ha secuenciado de acuerdo con un enfoque de clonación por fragmentos.

2/ *Caracterización molecular de la cepa de acuerdo con la invención comparada con cepas de Streptococcus thermophilus ya conocidas*

• *Secuencia del operón de PS*

La secuencia del operón de PS de la cepa *Streptococcus thermophilus* CNCM 1-2980 se ha obtenido a partir de un fragmento de ADN de aproximadamente 17100 pares de bases sintetizado por PCR en presencia de una matriz de ADN genómica purificada de la cepa y utilizando dos cebadores específicos de genes conservados (*deoD* que codifica una purina-nucleótido fosforilasa, y *orf14.9* de función desconocida) que flanquean generalmente al operón de PS en los *Streptococcus thermophilus* descritos en la bibliografía. La secuencia comprendida entre los genes *deoD y orf14.9*, que se corresponde con la secuencia SEC ID Nº 1, se proporciona en la lista de secuencias.

• *Organización genética del operón de PS*

La figura 1 esquematiza la estructura genética del operón de PS de la cepa CNCM I-2980 establecida por el análisis de su secuencia nucleotídica, así como la estructura del operón de PS de otras 7 cepas de *Streptococcus thermophilus.* Para las diferentes estructuras, identificadas por el nombre de la cepa y por el número de acceso GENBANK (entre paréntesis), las flechas representan la posición, el tamaño y la orientación de los genes desde el codón de inicio hasta el codón de fin. El significado de los colores y/o motivos en el interior de las flechas se indica en la leyenda de la figura 1.

• *Comparación con la bibliografía*

El análisis estructural del operón de PS de la cepa CNCM I-2980 demuestra que posee una organización global similar a la de los operones de PS ya conocidos (ver figura 1): un primer ORF potencialmente implicado en la regulación de la transcripción del operón de PS, seguido de 3 ORF que probablemente intervienen en la regulación de la polimerización de las unidades repetidas de PS y/o sus exportados, seguidos de 11 ORF que codifican glicosiltransferasas y una polimerasa que asegura el ensamblaje de la unidad repetitiva, seguidas estas mismas por 1 ORF potencialmente implicado en el transporte de las unidades repetitivas a través de la membrana plasmídica.

El entorno genético del operón de PS de la cepa CNCM I-2980 es también similar al de otros operones de PS conocidos, cadena arriba el ORF *deoD* codifica una purina-nucleótido fosforilasa, y cadena abajo en sentido opuesto los ORF *IS1193* y *orf14.9* codifican respectivamente una transposasa (que pertenece a la familia de secuencias de inserción *IS1193,* elementos genéticos móviles) y una proteína de función desconocida.

Por tanto, la comparación de secuencia realizada entre las proteínas potencialmente codificadas por los ORF del operón de la cepa CNCM I-2980 y las disponibles en las bases de datos públicas (GENBANK) demuestra que el contenido genético del operón de PS de la cepa CNCM I-2980 es nuevo en su parte distal.

- La parte proximal del operón de PS de *Streptococcus thermophilus*, y más generalmente la de los estreptococos hasta ahora conocidos, comprende 4 ORF denominados *epsA* (o *cpsA,* o *capA,* o *wzg), epsB* (o *cpsB,* o *capB,* o *wzh*), *epsC* (o *cpsC,* o *cpaC,* o *wzd*) y *epsD* (o *cpsD,* o *capD*, o *wze*) en los que los productos polipeptídicos deducidos, para cada uno de los 4 ORF, presentan importantes similitudes de secuencia entre las cepas. A este nivel, los productos polipeptídicos deducidos de los ORF *eps13A, eps13B, eps13C* y *eps13D* del operón de PS de la cepa CNCM I-2980 no difieren de los deducidos de otros operones de PS (porcentaje de aminoácidos idénticos superior o igual al 94%).

- Inmediatamente después de la ORF *epsD,* la ORF *epsE* (o *cpsE,* o *capE,* o *wchA*) está presente en la mayoría de los operones de PS conocidos en *Streptococcus thermophilus.* En este caso también, las similitudes de secuencia son importantes entre productos polipeptídicos homólogos procedentes de diferentes secuencias conocidas; el producto de traducción del ORF *eps13E* de la cepa CNCM I-2980 es muy similar a sus homólogos que provienen de otras cepas.

- La organización de los 4 ORF siguientes *(eps13F, eps13G, eps13H* y *eps13I)* del operón de PS de la cepa CNCM I-2980, ya descrito, es menos frecuente entre las diferentes estructuras conocidas de operones PS de *Streptococcus thermophilus.* Esta organización se ha encontrado, a veces de manera incompleta, en las cepas IP6757 (número de acceso a GENBANK AJ289861), "tipo VII" (número de acceso a GENBANK AF454498) y "tipo III" (número de acceso a GENBANK AY057915).

- En la parte distal del operón, los 7 ORF *eps13J, eps13K, eps13L, eps13M, eps13N, eps130* y *eps13P* son nuevos y específicos del operón de PS de la cepa CNCM I-2980. Aunque reducida, su similitud de secuencia a nivel proteico o en algunos casos la existencia de motivos proteicos específicos, permite asignar una supuesta función a los productos de estos ORF: actividad potencial de glicosiltransferasa o polimerasa para el producto de los ORF *eps13J a eps13O*, o actividad de transporte transmembrana de PS para el producto del ORF *eps13P*.

3/ Ensayo de reología comparado de la cepa Streptococcus thermophilus CNCM I-2980

Las cepas de *Streptococcus thermophilus* utilizadas CNCM I-2423, CNCM I-2429, CNCM I-2432, CNCM I-2978 y CNCM 1-2979 son cepas de colección de Rhodia Food. La mayoría de ellas se utilizan para la elaboración industrial de leches fermentadas o yogures y destacan por sus propiedades texturantes. Son representativas de cepas descritas en la bibliografía. Se han estudiado a continuación en comparación con la cepa CNCM I-2980 y se han considerado como representativas de cepas texturantes utilizadas actualmente en la industria agro-alimenticia.

La cepas de *Streptococcus thermophilus* RD736 y RD676 son cepas industriales de Rhodia Food reconocidas por su débil poder texturante. No se conocen los polisacáridos que pueden producir ni su operón de PS. Se han estudiado a continuación en comparación con la cepa CNCM I-2980 y se han considerado como representativas de cepas no texturantes.

La leche fermentada utilizada se obtiene añadiendo 100 ml de leche UHT semi-descremada (Le Petit Vendéen®) por 3% (peso/volumen) de polvo de leche descremada. La esterilidad de la solución se obtiene mediante pasteurización a 90ºC durante 10 minutos, la temperatura se mide en el interior de la leche. El soporte de fermentación obtenido de esta manera se inocula con la cepa a ensayar a razón de 10E+6 ufc/ml (unidad formadora de colonias/ml) después se incuba a 43ºC (al baño maría) hasta obtener un pH de 4,6. El seguimiento del pH se registra de manera continua. Las leches fermentadas obtenidas de esta manera se colocan en una estufa ventilada a 6ºC, hasta su análisis.

Se efectuaron dos tipos de mediciones reológicas: viscosidad y flujo. Las mediciones de viscosidad se realizaron a 8ºC sobre leches fermentadas, después de 1, 7, 14 y 28 días de almacenaje a 6ºC. El instrumental utilizado es un viscosímetro Brookfield® de tipo RVF (Brookfield Engineering Laboratories, Inc.) montado sobre un pie Helipath (Brookfield Engineering Laboratories, Inc.). El viscosímetro está equipado con una aguja de tipo C y la velocidad de oscilación aplicada a la aguja es 10 vueltas/minuto. Las mediciones de flujo se efectuaron a 8ºC sobre leches fermentadas, después de 14 días de almacenaje a 6ºC y que previamente se habían mezclado. El instrumental utilizado es un reómetro AR1000-N (TA Instrument) equipado con cilindros co-axiales (Radio 1 = 15 mm, Radio 2 = 13,83 mm, Altura = 32 mm, Entrehierro = 2 mm). Para el segmento ascendente, la tensión de barrido continuo aplicada varía de 0 a 60 Pa durante un tiempo de 1 minuto de acuerdo con un modo lineal. Para el segmento descendente, la tensión de barrido continuo aplicada varía de 60 a 0 Pa durante un tiempo de 1 minuto de acuerdo con un modo lineal. Los valores tomados en cuenta son el área de isotropía y el umbral de flujo; este último se calcula de acuerdo con el modelo de Casson.

La viscosidad de la leche fermentada obtenida con la cepa *Streptococcus thermophilus* CNCM I-2980 se midió después de 1, 7, 14 y 28 días de almacenaje a 6ºC (tabla 1). El valor de viscosidad medido después de un día de almacenaje es de 53,3 Pa.s. Este valor varía poco en el tiempo mostrando la estabilidad de la leche fermentada obtenida con la cepa *Streptococcus thermophilus* CNCM I-2980. Comparativamente (tabla 1), las viscosidades medidas para las leches fermentadas elaboradas con las cepas RD736 y RD676, consideradas como de débil poder texturante, están comprendidas entre el 26 y 30 Pa.s. Las otras cepas ensayadas generan leches fermentadas que presentan viscosidades más débiles que las obtenidas con la cepa CNCM I-2980. Se puede distinguir un grupo de cepas que generan viscosidades del orden de 40 Pa.s (CNCM I-2979, CNCM I-2423 y CNCM I-2432) y un segundo, al que pertenecen CNCM I-2980, que generan viscosidades del orden de 50 Pa.s.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Viscosidad y pH de las leches fermentadas obtenidas con las diferentes cepas ensayadas, después de diferentes tiempos de almacenaje a 6ºC

Cepas	Viscosidad en Pa.s/pH			
	Almacenaje 1 día	Almacenaje 7días	Almacenaje 14 días	Almacenaje 28 días
CNCM I-2980	53,3/4,50	53,0/4,44	53,0/4,42	53,5/4,40
CNCM I-2429	51,2/4,55	51,9/4,45	51,0/4,44	59,2/4,44
CNCM I-2978	50,4/4,56	51,8/4,52	49,6/4,49	51,0/4,45
CNCM I-2432	42,4/4,60	42,2/4,56	43,0/4,55	43,0/4,45
CNCM I-2423	42,0/4,60	41,9/4,40	42,0/4,37	43,0/4,30
CNCM I-2979	37,8/4,54	40,7/4,45	42,2/4,42	42,2/4,33
RD676	29,6/4,60	30,0/4,57	30,0/4,57	30,0/4,52
RD736	26,0/4,45	26,0/4,34	28,0/4,34	27,0/4,26

Las mediciones de flujo han permitido definir dos descriptores reológicos significativos (umbral de flujo y área de tixotropía) para la descripción reológica de las leches fermentadas (tabla 2). Para la leche fermentada obtenida con la cepa CNCM I-2980, los valores promedio son de 5,89 Pa y de 488 Pa/s para, respectivamente, el umbral de flujo y el área de tixotropía. Estos valores son significativamente diferentes de los obtenidos para las leches fermentadas obtenidas con las cepas consideradas como no texturantes (RD676 y RD736). Por ejemplo para la leche fermentada obtenida con la cepa RD676, estos valores promedio son respectivamente de 17,01 Pa y de 17083 Pa/s. En el caso de cepas consideradas como texturantes, los valores de umbral de flujo y área de tixotropía están mucho más próximos a los obtenidos con la cepa CNCM I-2980, pero significativamente superiores, mostrando una capacidad texturante superior a la de la cepa CNCM I-2980.

TABLA 2

Valores del umbral de flujo y del área de tixotropía (promedio de tres repeticiones) medidos usando el equipo AR1000-N de leches fermentadas obtenidas con las diferentes cepas ensayadas después de 14 días de almacenaje a 6ºC

Cepas	Umbral de flujo (Pa)	Área de tixotropía (Pa/s)
CNCM I-2980	5,89	488
CNCM I-2429	13,32	1215 (2 valores)
CNCM I-2978	10,51	728
CNCM I-2432	12,27	1245
CNCM I-2423	8,86	1344
CNCM I-2979	13,56	1786
RD676	17,01	17083
RD736	15,91	33100

4/ Caracterización sensorial de la cepa Streptococcus thermophilus CNCM I-2980, comparación con las cepas de referencia

Las leches fermentadas se evaluaron mediante un análisis sensorial después de 14 días de almacenaje a 6ºC. El análisis descriptivo cuantitativo de las leches fermentadas, conservadas a una temperatura óptima de degustación de 12ºC, lo realizó un jurado de 9 expertos sobre una escala lineal no estructurada de 0 a 6 puntos. Este análisis de perfil sensorial se duplicó con algunos días de diferencia. Los jueces, previamente seleccionados y entrenados, efectuaron su evaluación sobre 4 descriptores de textura en la cuchara: quebradiza, resistencia a la mezcla, fibroso, granulosidad, y sobre 4 descriptores de textura en la boca: se funde, adherencia, espesor, consistencia. Las diferencias sensoriales se evaluaron mediante un análisis de varianza (denominado ANOVA) de dos factores, de modelo fijo, seguido de un ensayo de comparación de promedio de Newman-Keuls con un umbral alfa del 5% sobre cada uno de los descriptores. Se puso en práctica un Análisis de Componentes Principales (ACP) con los descriptores sensoriales como variables y las cepas como individuos para visualizar el espacio producido. Una Clasificación Ascendente Jerárquica (CAH) permitió distribuir los grupos de cepas sobre el ACP. Los programas informáticos utilizados para estos análisis estadísticos son Fizz® (Biosystèmes), Statgraphics® y Uniwin plus®.

Los datos de la leche fermentada obtenidos con la cepa *Streptococcus thermophilus* CNCM I-2980 se compararon con los de las leches fermentadas obtenidas con las otras fuentes de referencia. Los valores promedio obtenidos con las diferentes cepas para los descriptores de textura aceptados se indican en la tabla 3 y las diferencias significativas que se obtienen de ANOVA y del ensayo de comparación de promedios se muestran en la tabla 4 y en las figuras 3 y 4.

TABLA 3

Promedio de las puntuaciones atribuidas por el jurado de análisis sensorial para las leches fermentadas obtenidas con las diferentes cepas del estudio sobre los descriptores de textura

	Descriptores en la cuchara				Descriptores en la boca			
Cepas	Quebra-dizo	Resistencia a la mezcla	Granuloso	Fibroso	Se funde	Adherencia	Espesor	Consistencia
CNCM I-2980	0,89	4,97	0,04	5,09	1,32	4,27	5,06	4,41
CNCM I-2429	4,12	3,49	1,53	1,24	3,36	1,46	3,54	2,94
CNCM I-2978	3,39	4,35	0,42	2,83	2,96	1,97	3,86	3,41
CNCM I-2432	3,28	3,14	1,60	1,32	3,11	1,43	3,01	2,91
CNCM I-2423	1,64	4,02	0,16	3,44	2,25	2,48	3,61	3,30
CNCM I-2979	3,98	2,79	2,36	0,74	3,71	0,72	2,39	2,22
RD676	4,98	1,46	5,14	0,17	4,98	0,04	0,91	1,03
RD736	4,35	1,45	3,43	0,04	5,18	0,31	0,77	0,67

TABLA 4

Comparación de promedios sobre cada descriptor de textura en la cuchara y de textura en la boca mediante el ensayo Newman-Keuls al 5%. Interpretación de los resultados: la diferencia entre las cepas relacionadas con una misma letra no es significativa

Cepas	Descriptores en la cuchara				Descriptores en la boca			
	Quebradizo	Resistencia a la mezcla	Granuloso	Fibroso	Se funde	Adherencia	Espesor	Consistencia
CNCM I-2980	E	A	E	A	D	A	A	A
CNCM I-2429	B	C	D	D	B	C	B	BC
CNCM I-2978	C	B	E	C	B	BC	B	B
CNCM I-2432	C	CD	D	D	B	C	C	BC
CNCM I-2423	D	B	E	B	C	B	B	B
CNCM I-2979	B	D	C	E	B	D	D	C
RD676	A	E	A	F	A	D	E	D
RD736	B	E	B	F	A	D	E	D

Las figuras 3 y 4 muestran una representación mediante histograma de los resultados obtenidos en la tabla 4.

Para las cepas RD676 y RD736, consideradas no texturantes, todos los descriptores se diferencian significativamente de otras cepas. Entre las cepas texturantes, la cepa CNCM I-2980 se diferencia netamente y significativamente en todos los descriptores, excepto en la granulosidad donde no se diferencia de las cepas CNCM I-2978 y CNCM I-2423.

El ACP permite situar las cepas en función de su distancia en relación a los descriptores sensoriales.

El plano 1-2 del ACP en la figura 2 representa el 97,3% del espacio producido. La componente 1 divide dos grupos de variables sensoriales. El primer grupo constituido por las variables: resistencia a la mezcla, espesor en la boca, consistencia en la boca, fibroso en la cuchara y adherencia en la boca, explica la componente 1 a la derecha. El segundo grupo, constituido por las variables: se funde en la boca, quebradizo en la cuchara y granulosidad en la cuchara, explica la componente 1 a la izquierda. El primer grupo de variables es anti-correlativo con respecto al segundo grupo. Estas variables permiten analizar las situaciones de las cepas sobre el plano. Por otro lado, el análisis en CAH permite clasificar las cepas en diferentes grupos que se representan en forma de círculos indicados sobre el plano factorial 1-2.

El plano factorial divide varios grupos de cepas que aportan propiedades de textura diferentes. A partir de estos análisis se obtiene que las cepas RD736 y RD676 proporcionan a la leche fermentada una textura quebradiza y granulosa en la cuchara y que se funde en la boca. Del mismo modo, no proporcionan una textura espesa, adherente o consistente en la boca, ni son resistentes o fibrosas en la cuchara en comparación con otros grupos de cepas. Proporcionan por tanto una leche fermentada no texturizada. Por el contrario, las cepas CNCM I-2429, CNCM I-2432 y CNCM I-2979 proporcionan leches fermentadas medianamente texturizadas; las cepas CNCM I-2423 y CNCM I-2978 proporcionan leches fermentadas texturizadas, y la cepa CNCM I-2980 proporciona una leche fermentada muy texturizada. Este análisis demuestra que la cepa CNCM I-2980 aporta características de textura muy particulares en la leche fermentada en comparación con el resto de las cepas de referencia.

5/ *Ensayo comparativo de resistencia a fagos de la cepa Streptococcus thermophilus CNCM I-2980*

La sensibilidad de una cepa a un bacteriófago se establece por el método de placas de lisis. Se utilizaron cien μl de un cultivo de la cepa a ensayar y 100 μl de una dilución apropiada de un suero que contenía el bacteriófago a estudiar para sembrar 5 ml de medio agar sobreenfriado (agar al 0,6% peso/volumen) M17 suplementado con glucosa 10 mM en $CaCl_2$. La mezcla se vierte sobre la superficie de medio agar solidificado (agar al 1,5% peso/volumen)

M17 suplementado con glucosa a 10 mM en $CaCl_2$. Después de incubar a 42ºC durante 16 horas, la sensibilidad de la cepa al bacteriófago se evalúa por la presencia de placas lisis. La ausencia de placas de lisis significa que esta cepa es resistente a los bacteriófagos ensayados. El espectro de sensibilidad de una cepa a los bacteriófagos (denominado también lisotipo) está constituido por el conjunto de sensibilidades y resistencias a los bacteriófagos estudiados.

La tabla 5 mostrada a continuación define los bacteriófagos utilizados para este estudio y su cepa de origen/propagación. Son cepas y fagos procedentes de la colección de Rhodia Food. Los bacteriófagos se seleccionaron por su poder infeccioso en las cepas texturantes de referencia.

TABLA 5

Fagos

Nombre del fago	Cepa de origen
2972	CNCM I-2423
4082	RD729
4074	CNCM I-2429
4154	CNCM I-2429
1272	CNCM I-2978
4128	RD852
1255	CNCM I-2432
1765	RD728
4121	RD862

Para evaluar el interés industrial de la cepa CNCM I-2980 con respecto a los problemas asociados con los bacteriófagos, se evaluó y se comparó el lisotipo de la cepa CNCM I-2980 con el de las cepas texturantes de referencia. La tabla 6 muestra las sensibilidades de las cepas a estos diferentes fagos (lisotipo) establecidas por el método de placas de lisis. Se observa que las seis cepas del estudio tienen lisotipos diferentes. En particular, la cepa CNCM I-2980 presenta un lisotipo distinto al de las otras cepas texturantes ensayadas. En efecto los fagos ensayos no han podido infectar a la cepa CNCM I-2980.

TABLA 6

Lisotipo de cepas ensayadas

Fagos	Cepas					
	CNCM I-2980	CNCM I-2423	CNCM I-2978	CNCM I-2432	CNCM I-2429	CNCM I-2979
2972	-	+	-	-	-	-
4082	-	+	-	-	-	-
1272	-	-	+	-	-	-
4128	-	-	+	-	-	-
1255	-	-	-	+	-	-
1765	-	-	-	+	-	-
4074	-	-	-	-	+	-
4154	-	-	-	-	+	-
4121	-	-	-	-	-	+
+ : sensible al fago ensayado; -: resistente al fago ensayado						

REIVINDICACIONES

1. Cepa bacteriana láctica que comprende al menos una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las secuencias de nucleótidos SEC ID Nº 1, SEC ID Nº 2, SEC ID Nº 3, SEC ID Nº 4, SEC ID Nº 5, SEC ID Nº 6, SEC ID Nº 7, SEC ID Nº 8 y los ácidos nucleicos que comprenden al menos un ORF cuyo producto de traducción posee un porcentaje de restos idénticos superior o igual al 80% con al menos una de las secuencias polipeptídicas procedentes de las ORF identificadas en las secuencias SEC ID Nº 1 a SEC ID Nº 8.

2. Cepa bacteriana láctica de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizada** porque se escoge entre los géneros *Streptococcus, Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus y Bifidobacterium.*

3. Cepa bacteriana láctica de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 **caracterizada** porque pertenece a la especie *Streptococcus thermophilus.*

4. Cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada el 26 de febrero del 2003 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos con el número I-2980.

5. Secuencia de nucleótidos SEC ID Nº1.

6. Secuencia de nucleótidos SEC ID Nº2.

7. Secuencia de nucleótidos SEC ID Nº3.

8. Secuencia de nucleótidos SEC ID Nº4.

9. Secuencia de nucleótidos SEC ID Nº5.

10. Secuencia de nucleótidos SEC ID Nº6.

11. Secuencia de nucleótidos SEC ID Nº7.

12. Secuencia de nucleótidos SEC ID Nº8.

13. Ácido nucleico que comprende al menos una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las secuencias de nucleótidos SEC ID Nº1, SEC ID Nº2, SEC ID Nº3, SEC ID Nº4, SEC ID Nº5, SEC ID Nº6, SEC ID Nº 7, SEC ID Nº8, o un ácido nucleico que comprende al menos un ORF en el que el producto de traducción posee un porcentaje de restos idénticos superior o igual al 80% con al menos una de las secuencias polipeptídicas procedentes de los ORF identificados en las secuencias SEC ID Nº1 a SEC ID Nº8.

14. Vector de clonación y/o de expresión que comprende al menos una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las secuencias de nucleótidos SEC ID Nº1, SEC ID Nº2, SEC ID Nº3, SEC ID Nº4, SEC ID Nº5, SEC ID Nº6, SEC ID Nº 7, SEC ID Nº8 o un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 13.

15. Vector de acuerdo con la reivindicación 14 **caracterizado** porque es un plásmido.

16. Bacteria hospedadora transformada por un vector o un plásmido de acuerdo con las reivindicaciones 14 ó 15.

17. Bacteria de acuerdo con la reivindicación 16 **caracterizada** porque es una bacteria láctica.

18. Bacteria de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, **caracterizada** porque es una bacteria láctica escogida entre los géneros *Streptococcus, Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus y Bifidobacterium.*

19. Procedimiento de construcción de una cepa de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 o de una bacteria de acuerdo con las reivindicaciones 16 a 18 **caracterizado** porque la cepa o la bacteria se obtiene por transformación usando un vector que comprende al menos una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las secuencias de nucleótidos SEC ID Nº1, SEC ID Nº2, SEC ID Nº3, SEC ID Nº4, SEC ID Nº5, SEC ID Nº6, SEC ID Nº 7, SEC ID Nº8 o un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 13.

20. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19 **caracterizado** porque la transformación se realiza después de una inserción en el genoma de la cepa o de la bacteria por al menos un evento recombinante

21. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19 ó 20 **caracterizado** porque el vector es un plásmido.

22. Composición bacteriana que comprende al menos una cepa de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 4 o al menos una cepa obtenida de acuerdo con el procedimiento de las reivindicaciones 19 a 21 o al menos *una* bacteria transformada de acuerdo con las reivindicaciones 16 a 18.

23. Uso de una cepa de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 o de una cepa obtenida de acuerdo con el procedimiento de las reivindicaciones 19 a 21 o de la composición bacteriana de acuerdo con la reivindicación 22 para elaborar un producto alimenticio o un ingrediente alimenticio.

24. Uso de acuerdo con la reivindicación 23 **caracterizado** porque el producto alimenticio o ingrediente alimentario es un producto lácteo, un producto cárnico, un producto cereal, una bebida, una espuma o un polvo.

25. Composición alimenticia o farmacéutica que comprende al menos la cepa de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 o al menos una cepa obtenida de acuerdo con el procedimiento de las reivindicaciones 19 a 21 o la composición bacteriana de acuerdo con la reivindicación 22.

26. Producto lácteo que comprende al menos la cepa de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 o al menos la cepa obtenida de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 19 a 21 o la composición bacteriana de acuerdo con la reivindicación 22.

27. Producto lácteo de acuerdo con la reivindicación 26 **caracterizado** porque es leche fermentada, yogur, crema madurada, queso, queso fresco, bebida láctea, producto lácteo retenido, queso fundido, crema de repostería, requesón o leche infantil.

28. Producto lácteo de acuerdo con las reivindicaciones 26 o 27 **caracterizado** porque comprende leche de origen animal y/o vegetal.

Figura 1: Estructura genética de los operones de PS de *Streptococcus thermophilus*

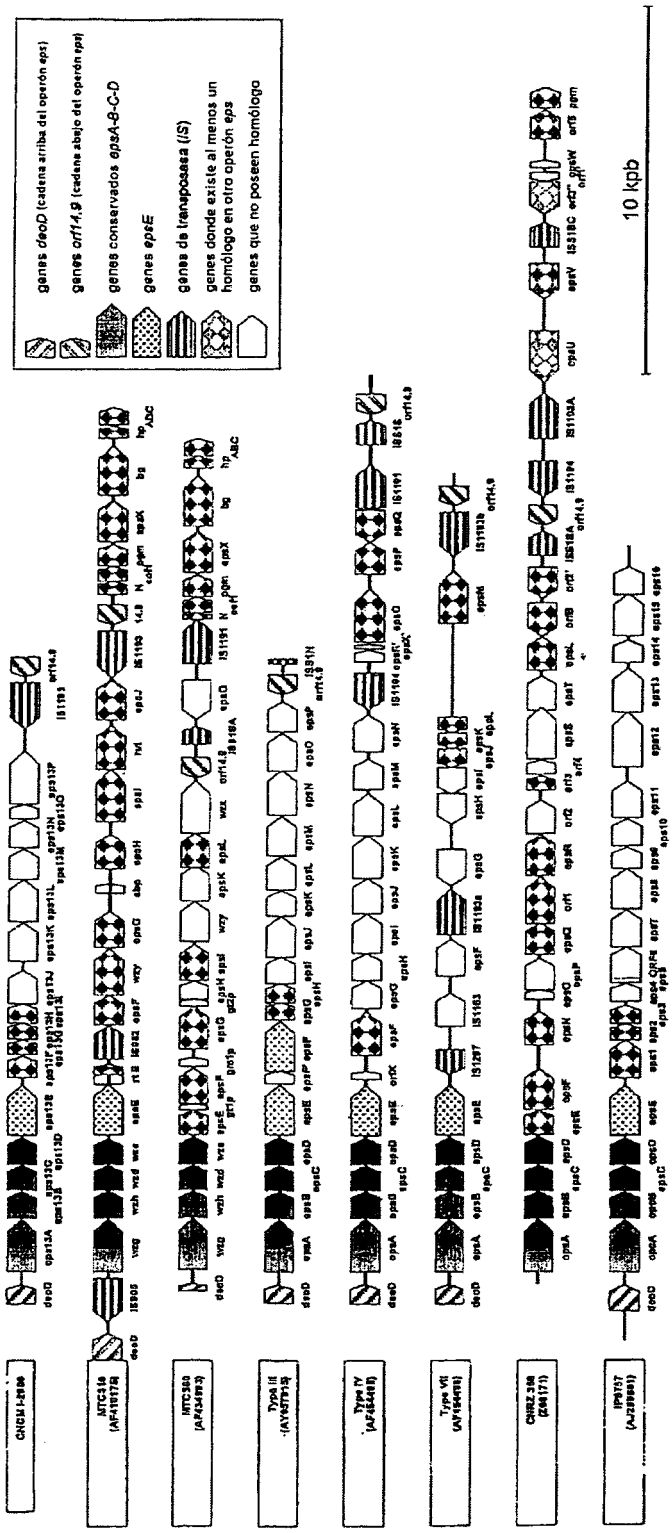


Figura 2: Representación gráfica del plano factorial 1-2 del ACP obtenido a partir de datos sensoriales sobre las leches fermentadas obtenidas con las diferentes cepas del estudio.

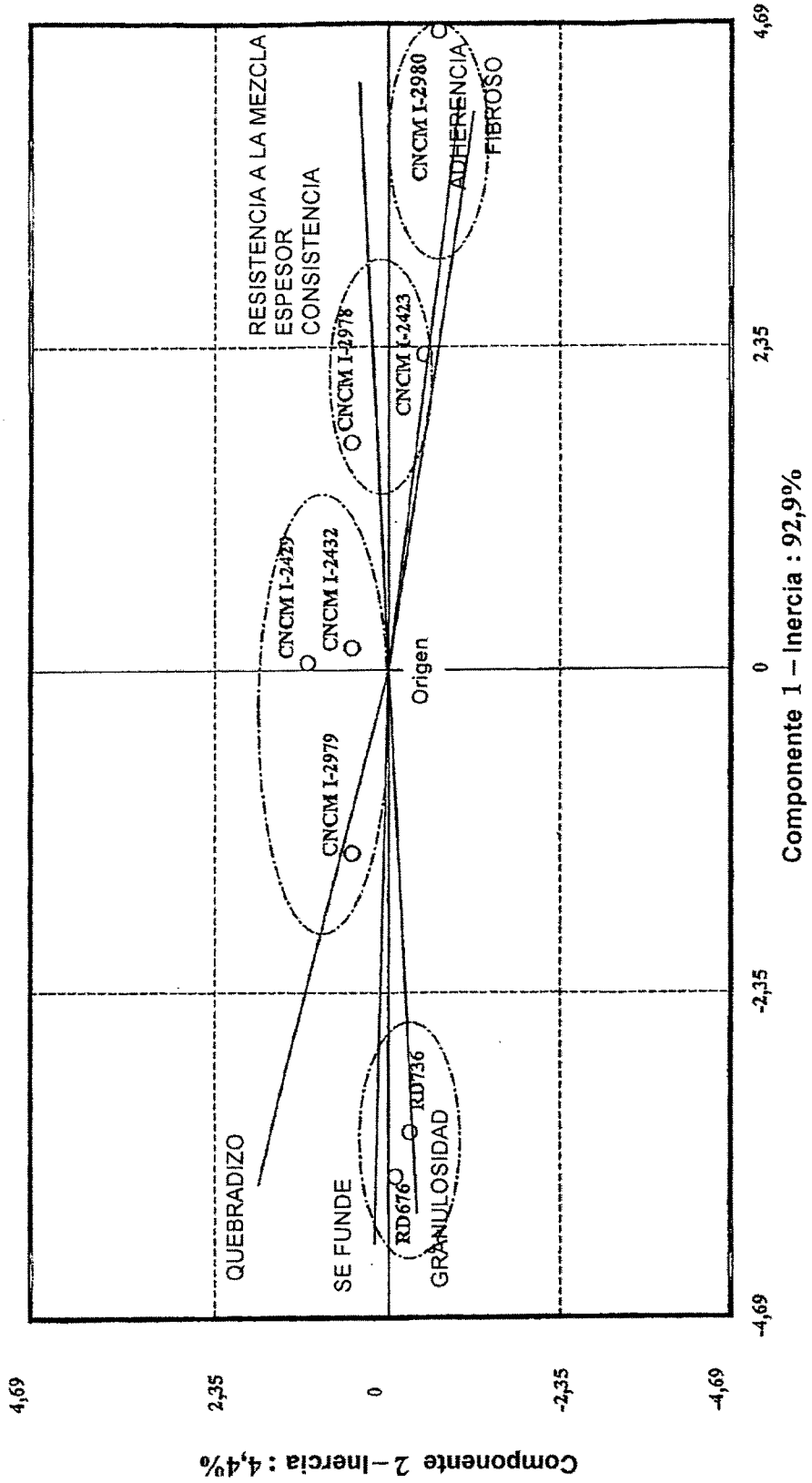
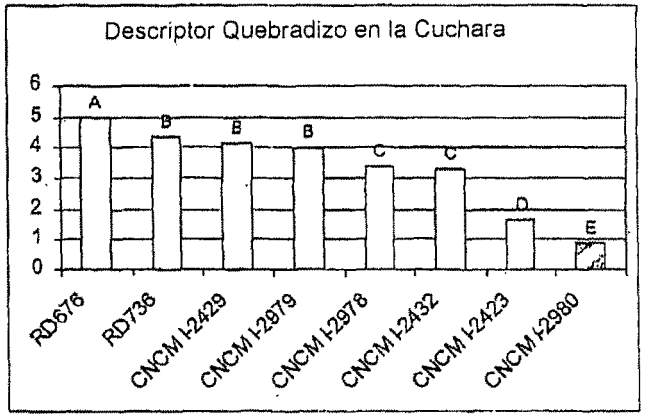
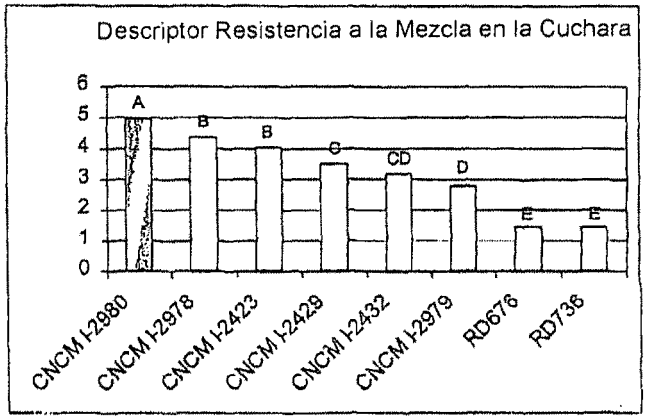
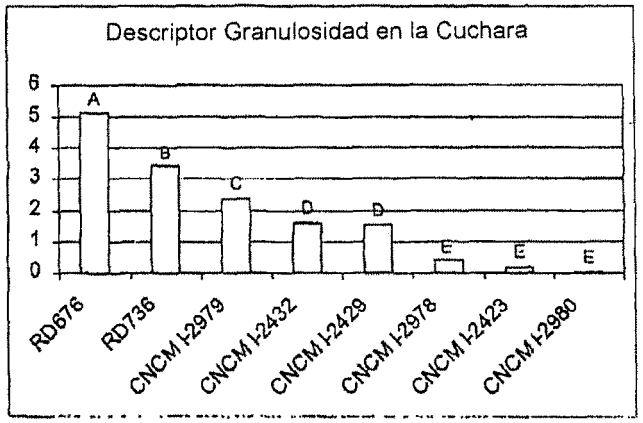


Figura 3: Representaciones gráficas de promedios de puntuaciones obtenidas sobre los descriptores de TEXTURA EN LA CUCHARA para cada una de las cepas del estudio. Interpretación de los resultados del ensayo de Newman-Keuls: la diferencia entre las cepas relacionadas con una misma letra no es significativa.







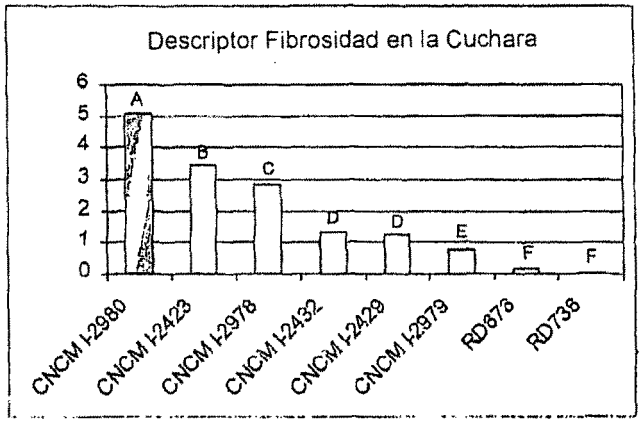
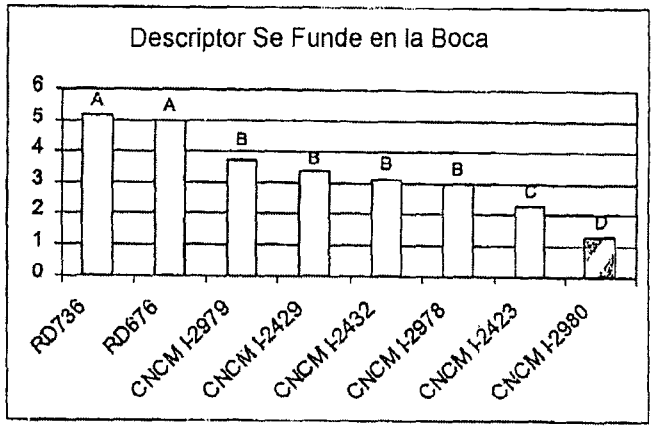
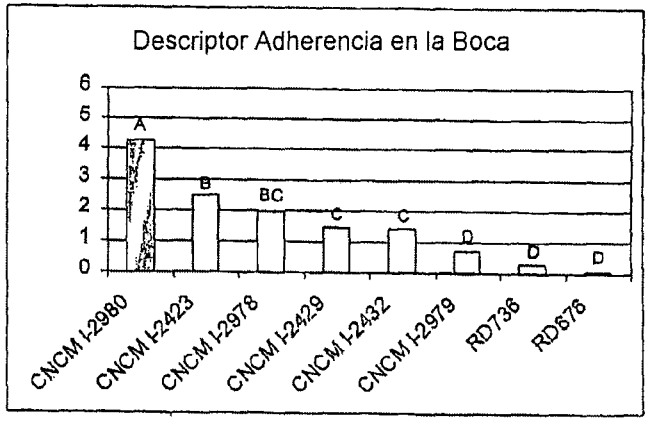
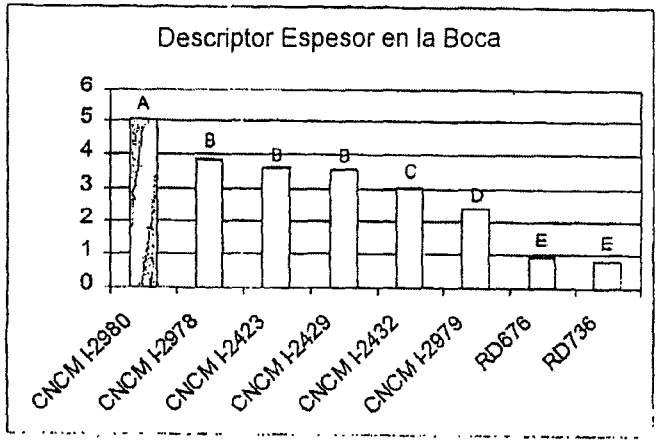
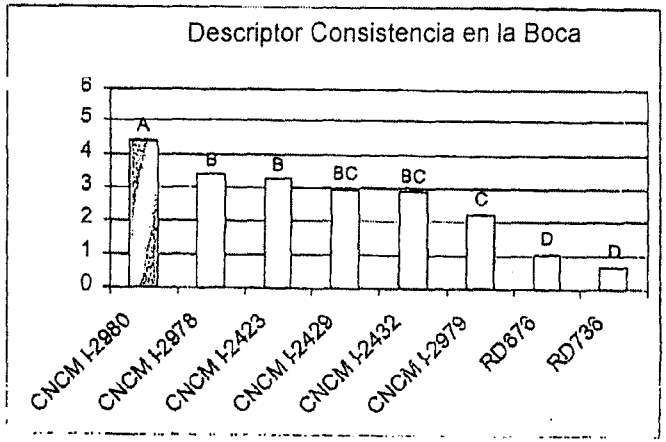


Figura 4: Representaciones gráficas de promedios de puntuaciones obtenidas sobre los descriptores de TEXTURA EN LA BOCA para cada una de las cepas del estudio. Interpretación de los resultados del ensayo de Newman-Keuls: la diferencia entre las cepas relacionadas con una misma letra no es significativa.









LISTA DE SECUENCIAS

<110> RHODIA CHIMIE

<120> Bacterias lácticas texturantes

<130> P 02244

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
<211> 16032
<212> ADN
<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 1

```
tttgtaaaag gacgccattt ggtcgtcctt ttgtgttgta gctaatatct gttcgaagtg     60
ataataagtt aaaatttttc aaactactag aaaaaataaa aatatttgga agaagaagac    120
ttttaataaa taggtaaata tctgacaatt taaagtttaa ctactaaaaa tgtgaaagat    180
agttcacaat ataatggaaa atgatataaa ttaaatgatt gatatcataa tgaaaacgtt    240
tttttgtttt tttttgaaaa aaatgacaat tgaaatgaaa ttgtattaat gttacaataa    300
taatggggaa tacttaattt taatttttag gagcaattta tatgagttcg cgtacgaatc    360
gtaagcaaaa acgtacgggt aatagatcat gggggatggt caacgttgga ttgaccattc    420
tgtatgctat tttagcattg gtcttattat tcaccatgtt caattataat ttcctatcct    480
ttaggttttt gaacatcatt atcactattg gtttgttggt agttcttgct attagcatct    540
tccttcagaa gactaagaaa tcaccactag tgacaacggt tgtattggtt atcttctcgc    600
tagtttctct ggttggtatt tttggtttta aacaaatgat tgacatcact aaccgtatga    660
atcagacggc agcattttct gaagtagaaa tgagcatcgt ggttcctaag gaaagtgaca    720
tcaaagatgt gagccagctt actagcgtac aggcacctac taaggttgat aagaacaata    780
tcgagatctt gatgtcagct ctcaaaaaag ataaaaaagt tgatgttaaa gttgatgatg    840
ttgcctcata tcaagaagct tatgataatc ttaagtctgg caaatctaaa gctatggtct    900
tgagtgggtc ttatgctagc ctactagagt ctgtcgatag taattatgct tcaaatctaa    960
aaacaattta tacttataaa attaaaaaga agaatagcaa ctctgcaaac caagtagatt   1020
caaaagtctt caatatttat attagtggta ttgataccta cggttcgatt tcaacagtgt   1080
cacgttcaga tgtcaatatt attatgacag taaacatgaa tacacataag attctcttga   1140
cgactactcc acgtgatgca tacgttaaga ttcctggtgg tggagcagac cagtatgata   1200
aattaacccc cgcaggtatt tatggcgttg aaacatctga acaaactctg gaagatctat   1260
atggtactaa gattgattac tatgcccgaa ttaactttcac atctttcctt aagttgattg   1320
accaacttgg tggtgtgaca gtccataatg atcaagcttt cacaagtctt catgggaagt   1380
ttgatttccc agttggagat atccaaatga attcagagca agcacttgga tttgttcgtg   1440
aacgctatag tttagatggc ggagataatg atcgtggtaa aaaccaggaa aaagtcattt   1500
ctgcgattgt aaacaagttg gcttctctaa agtctgtatc aaactttact tcaatcgtta   1560
ataatctcca agactctgtt cagacaaata tttctttgga taccattaat gctttggcta   1620
atacacaact tgattcaggt tctaaattta cggtgacttc tcaagcagta actggtacag   1680
gttcaaccgg acaattgacc tcttatgcga tgccaaattc tagtctttac atgatgaaac   1740
tagataattc gagtgtggca agtgcctctc aagctatcaa aaatctaatg gaggaaaaat   1800
aagtgattga cgttcactca catattgttt ttgatgttga tgatggtcct aaaactttag   1860
aagaaagttt agatctcatt ggtgaaagtt acgcccaggg ggtacgtaag attgtttcaa   1920
catcccatcg tcgtaagggg atgtttgaga ctccagagga taaaattttt gccaactttt   1980
ctaaggtaaa agcagaagca gaagcacttt atccagactt aactatttat tatggaggtg   2040
aactttatta caccttagac attgtggaga aacttgaaaa gaatctcatt ccgcgcatgc   2100
acaacactca atttgctttg attgagttta gtgctcgcac atcttggaaa gaaattcata   2160
gtgggcttag taatgttttg agagcggggg taacgcctat tgttgctcat attgagcgct   2220
atgatgccct cgaagaaaat gctgaccgtg ttcgagaaat catcaacatg gggtgctata   2280
ctcaagttaa tagctctcat gttctaaaac caaagctctt tggagataaa gataaagtaa   2340
```

gaaaaaaacg tgttcgttat tctttggaga aaaatttggt tcatatggtt gctagcgaca 2400
tgcataatct tgggccgaga ccaccattta tgaaagatgc ttatgaaatt gttaaaaaga 2460
actacggccc caaacgtgct aagaatcttt ttattgaaaa tcccaaaaca ttactagaaa 2520
atcaatattt ataggagata ttatgaatca agataacact aaaagtgatg aaatcgacgt 2580
actagcattg ctacataaac tttggacgaa gaagcttttg attctttca cagctttta 2640
tttcgctgct ttcagtttct taggtactta tttctttatc caaccaacat atacatcaac 2700
aacgcgtatc tatgttgtta atcaggcaac agataataat aatctttctg ctcaagattt 2760
gcaagctggt acctatttgg caaatgacta taaagagttt attacatcaa atgatgtatt 2820
atcagaagtt attaaagatg aaaaattgaa tttgagtgag gcagaactgt ctaaaatcgt 2880
ttcagttaat attcctactg atactcgtct tatttcaatt tctgttaatg ctaaaactgg 2940
tcaagatgcg caaacacttg ctaataaggt tcgtgaagtt gcttcaaaaa aaatcaacaa 3000
ggtgacaaaa gttgaagatg tcacaacgct cgaagaagct aaattgccag agtcaccatc 3060
ttcaccaaat atcaaacgta atgtgcttct tggggcagtg cttggaggat tccttgcagt 3120
ggttggtgta ttggtacgtg aaatcctaga tgatcgtgtt cgccgtccag aagatgtgga 3180
agatgccctt ggaatgacac ttcttggaat tgtccctgat acagataaga tttaaggaga 3240
agaaatgcct ttattaaagt tagttaaatc aaaagtagac tttgctaaaa agacggaaga 3300
gtattataac gctattcgca caaatattca attttctggt gctcagatta aagtgattgc 3360
gattagctct gttgaaactg gtgaaggaaa atcaacgaca tctgttaact tggcgatttc 3420
atttgctagt gttgggctcc gaacacttct gattgatgcg gatacgcgta attctgtttt 3480
gtcgggtaca tttaaatcaa atgagcctta taaaggtctt tcaaatttcc tttcaggaaa 3540
tgccgatcta aatgaaacga tttgccaaac tgatatttct ggtttagatg ttattgcatc 3600
tggtcctgta ccacctaatc caacaagtct tttgcaaaat gacaatttta gatattttgat 3660
ggaagttgct cgtagtcgtt atgattatgt tatcatttat acatcaccaa ttggtctggt 3720
cattgatgct ggtattattg cccatcaggc tgatgctagt cttttggtta cagcagctgg 3780
aaaaattaaa cgtcgtttcg taactaaggc ggtcgaacaa ttgaaacaaa gtggttctca 3840
gttcttaggt gtcgtcctta ataaagttga catgacagtt gataaatatg gatcatatgg 3900
ttcttacgga tcatatggtg agtacgggaa aaaaacagac caaaaagaag gtcattcaag 3960
agcacatcgt cgtagaaaag gatagcatta atgccgatga tgcggctcct tataccttaa 4020
cagattaaaa agggggtttag agtgaaagaa aaacaagaaa ttcgtcgcat tgaaattggt 4080
attatacagt tggttgtggt tgttttcgca gccatggtag ctagtaaaat accatataca 4140
gagattaccc aaggaagtat tgtcctttta ggtgtcgtac atgtagtgtc ttactatatc 4200
agtagttatt atgaaaatct taagtataga ggctacttgg atgaactcat tgcaactgtc 4260
aaatattgtt tcatatttgc tctaattgca acatttctct cgtttttgc agatggaagt 4320
ttttcaatct cacgtcgcgg acttctttac gtcaccatga tttcaggtgt tctcttatac 4380
gttacaaata ctgttcttaa gtatttccgc tcatctattt atacacgtcg taaaagtaac 4440
aagaatattc tcttgatttc tgatcaggca cgtcttgata atgttttatc tcgtatgaag 4500
gacaatatgg atggtaggat ttcagcagtt tgtgtcttgg ataatcctta tttcactgat 4560
ccatttatca agagtgttaa acctgaaaat ttgattgaat atgcgacaca ctcagtagta 4620
gaccaagttt tgattaatct gccaagtgag cagtacaaga tttggattta tgcgtcacca 4680
tttgaactta tgggaatccc agtatccatt aatttgaatg cccttgaatt tatgagtcag 4740
ggtgaaaaac gtatccaaca attgggtcct ttcaaagttg ttacgttttc tacgcatttt 4800
tatagctatg gagatatctt ggcgaaacgc ttcctcgata tctgtggagc tctagttggt 4860
ttggtgctct gtgggattgt tggaatcttc ctttatccac ttattcgtaa ggatggtggg 4920
ccagccattt ttgctcaaga ccgtgtggga gaaaatggac gtatcttcaa gttttataaa 4980
ttccgttcta tgcgtgttga tgctgaggaa attaaaaagc aattgatgga taaaaatcaa 5040
atgtctggtg gtatgtttaa gatagacaat gatccacgta ttaccaaaat tggacatttc 5100
attcgtaaaa caagtcttga tgaacttcca caattttgga atgttctaaa aggtgatatg 5160
agcttggtag gaacacgtcc accaacattg gatgagtacg aatcttatac accggaacaa 5220
aaacgtcgtt taagttttaa acctggtatc acaggtcttt ggcaagtaag tggacgaagt 5280
gaaattactg atttgatga agttgtaaaa ctagatgttg cttatatgga tgggtggaca 5340
atctggcgag atatcaaaat cttattgaaa acgattaaag tagtagtaat gaaggatgga 5400
gcaaaatgat aacttcaaag atgattagat gagaaaaata atttatattg ttgcttctaa 5460
agggattcct gcaaaatatg gtggatttga gacctttgtt gagaagttga cagagttcca 5520
ataagacaaa gatatccaat attatgtagc ttgtatgcgt gaaaactctg caaaatcagg 5580
aattagagca gatactttat caactgcact gtgcgtagat acaaatatct attccttatg 5640
actgctgaac aacagaagaa tacattagtc attaccacca ctgagagatt gcgattaatg 5700
gagggctct ttgagtcaga tcaacttcct atcaaatatt tggcaggtat agtagtcatc 5760

ggagatggtg aagtggcgtt tccagaggga gtcccaataa ttccttttga tgatgcgatt 5820
gactttgcga ctcatgaagt tgtcgaccat gtgtttatca acttaccgag tgaacattac 5880
gatctcaaac atcttgtttc cgattttgaa gtcatggcta ttgatgtgag tgtagatatt 5940
aacttatttg atttcagggc tttaaaaaat aaaaaaatca aacaagttgg agaccatagt 6000
atcgtgactt ttaactccaa ttactacaaa catagccata tctttctaaa gcgcatgttg 6060
gatatctttg gggctgtgat tggtcttcta atttgtggtc tggtcgggat tgtcttagct 6120
cctatcattc ggaaagatgg aggaacctgc tattttcgtt cagaaacgag tagggaaaaa 6180
cggtcgtatc tttaattttt ataaattccg ttctatgtat atagatgcag aaaaacggaa 6240
aaaagaactt atggctcaaa accagatgca gggtggtatg tttaaaatgg ataatgaccc 6300
acggattaca ccaattggtc agtttatccg aaaaacaagt ctggatgaat tgccacagtt 6360
ttataatgta ctagttggtg atatgagctt ggtaggtact cgtccaccga cagtggatga 6420
atttcaaaag tatacaccaa gtcaaaaacg acgacttaat tttaaaccgg ggattaccgg 6480
cttatggcaa gttagtgggc gtagcaatat tacggacttt gacgaagtag ttaaactcga 6540
tgttcaatac atagataact ggtcaatttg gtcggatatc aagatattgt tgaagactat 6600
cttcgtagta tttaaaaaag agggaagtaa gtagagtata tcatgaaagt ttgtttagta 6660
ggttcttctg gtgggcattt ggcacacttg aatatgctta aacctttttg gagtgaacag 6720
gaccgctttt gggttacctt tgataaagaa gatgcaagaa gtattttaaa agatgagcag 6780
ttttatccgt gctattttcc tactaacaga aattttaaaa atttagtaaa gaatactttt 6840
ttagcactta aaattttaag aaaagaaaga cctgacgtta ttatttcatc aggagcagcg 6900
gtagcagttc cgtttttttta tcttggtaaa ctgtttggag cgaaaacggt ttatatagaa 6960
gtatttgata gaatagataa accgacagta actgggaaat tggtttatcc agtgacagat 7020
aaatttattg ttcagtggga ggagatgaaa actgtctatc ccaaagctat taatctgggg 7080
agtatttttt aatgattttt gttacagtgg gaacccacga acagcccttt aataggctta 7140
ttaaggaagt tgatcgttta aaaaaagaag gtattattac agatgaggtt tttattcaga 7200
caggtttttc aacttatgaa cctcaatact gtgactggaa aaaacttatc tcttattctg 7260
agatggacaa ctacatgact cactctgata tcattataac ccatggtggt ccagcgacat 7320
tcatgggagc aattgccaaa ggcaaaaaac caattgttgt tccaagacaa gaaaaatatg 7380
gagaacatgt aaatgatcat cagttagagt ttgcagaaca ggtttctgga cgttttggga 7440
gtattattgt tgtagaagat attacttcac tctgtgaaat tttattaaaa ggaagtaacg 7500
ttatttgcca aaagcagagt caattttacc ctaaaggatc acagtttatt tttaaattca 7560
aagagatagt tgatgaactt gtagaaggag agattcgtga aacctaaaat acttgtactt 7620
atggcaacct ataatggagg aaaatactta cgagagcaat tagatagtgt ttttttacaa 7680
aaaaatgtgg atattactgt cctggttcgt gacgatggtt caattgacaa tacgtgtgct 7740
attcttgatg aatatagtaa gagatacaac ttaatatggt attcagggca acatctaaat 7800
gttgcgaatg gattttataa tttgatggaa gaagcagtca aaatggattt tgactacttc 7860
gctttctgtg atcaggatga tgtttgggat acagataaac tttccatcgg agtttctgca 7920
atttgtagtt ttaatgaacc tgctttatat tattgtggtc aaagattggc cgacggtaat 7980
ttaaatttta tagcaaatca tgaactcaac acagaacgga cactccatac aaggtttatc 8040
ctttctgatt ttgctggttg tacaggagtt ttcaataaat cgttattaaa ggaagttgtt 8100
agctatagac cgaagtatat gttgatgcat gatacatgga tattaaaagt ctgtttggct 8160
ctaggtgcac aggttattat tgatacaaga ccgcatatgt attataggca acatggtggt 8220
aatacagttg gtcttggaag aagtctatct gcatacttca aacaggtaaa acagtatata 8280
actgaatata aagtggaacc acagatgaag gaacttctct taggatatgg tgatagaatt 8340
atttcggagt atgctgtaat tgcaaatgct tgttgtaatt ataaaacgga tcgtgaggca 8400
cgtacttttt tattaaatag aaataatgtt gatttttgca cgatgggatt aaatatcacc 8460
tttaaattaa aagttctatt aaataaatta taatttatta ggacgttggt attggaaata 8520
ttttaatatt acctatattc ttattacaat aggaaagtta tttgcgattt taatataaaa 8580
tttgtaggac caatgaaata tttaaaagga accttgctat ttacaatatt aaaagacagc 8640
aatccttaat ttgttaaata atttgctttt tctttgggat tattccaaag aaataagatt 8700
atatttttgt tgttaaaatt ggatatatag taaatttaaa atatcacttt aaaagtaagt 8760
aaatggagga agagtttttg ctttttagta ttataatacc tgtttttaat gtcgaaaaat 8820
atcttgagga gtgccttctc tcgattatag ggcagactga tgaaatatct gaaggatgtg 8880
aaataattct tattaatgac gggtcaacag atgatagtgc gaaaatttgt gatgagtatg 8940
agcgaaaata tcctgaattg ataaaggtat ttcataggtc aaatcatggt ttgcttctta 9000
cacgaaggtt tggatatcaa catgccgtag gaagatacat aattaattgt gactcagatg 9060
attcgttgga accgattgca cttgaggtgc tcaaagacgc aatcgtcgaa tacaacaacc 9120
cagatgttat tatatttaac cacaatacat ataaaaatgg tgtaaaggag attgcataca 9180

ataacatttt tacagagtct gtttctgccc agatagataa gctagatgtg ttgaaagagt 9240
ttctgactgg aaatcgtatt aatagcgttt gtggtgcaat ttgtaaaaag gattgtattg 9300
atataaatag agactataat aaatataaag gtcttaataa tggagaagat agccttcaaa 9360
agattgaaca attcaaaagt gcgaacacgt ttgcatatat aaataaaccc ctctataatt 9420
atagggcagg atcgggtatg accacaaaat ttgatcgaaa ttattttaaa tcttttagaa 9480
tagttctgga tgaaattcaa aaagaacgag aaatgtggga ttttcctgat gtagatagat 9540
atttttcaat taaagttttg tctattgctg gaagagcaat cacacagtca agatacaatt 9600
gttgggagaa taaaagcgag caaataagat acttgcatga tattcgtaat gatgactact 9660
ttaaaaaagc agtgcttcaa ttggctacaa taaggaaata tcttcagaaa gaccatattt 9720
tactaataaa gatgttggat aagggtttga ttcgtcttat agttttgatg ttggatatta 9780
aaaataagat aggctgagtt tgagagggaa agtttttaga ggataaatga atagtataga 9840
taagaagtat cgtattaaac ttgatacgtt aatatttttg atttttatta tgttagcaac 9900
tttcaactat tcgatggagt tatcaatagt tggaaatcca ttcaggcaag tgattcttgt 9960
actgatgctc atattattgt tgtttacaat catccttaag aaatacacaa taaaaaaaat 10020
gattgtattt attacggcta tagtgtatgg attagttaac tatcgagttt caggttatac 10080
agacttattt attttattgc ttgcggcgta tgttgcggat caagtagatt ttaataacgt 10140
gttaaaagtt ctattttggg aaaaattagt gatattttta tcgcttaata tattttcagt 10200
gcttggtgta atagagatga ctaaattctc catcaataag tatctatcca ttgtagaagc 10260
atatgctcca ggatatgttt cttcgaatgt atatggctgc caagcaggag ttttattttt 10320
actttattta tcaattaatc ggtataaatt gacaaagtta aaagttctat tagtttggtt 10380
tttgagtgtt ttagtataca ttatttgtag atcaaggaca gagctaatct tagtatcagt 10440
aacaacagtt cttttattaa tatgtaataa tccaaaaaac tttaataaag ttaagaggat 10500
actctcgtgg ggatatccat ctattttggt tttaaatttt gggttaatat atacttttte 10560
aatactcggt tacggtaatc ccattatgag cactgtaaat gatgtattat tcaatgggag 10620
aattggcttg gctctcatga attttaatac ttatggtatt tcattatttg gctccccaat 10680
tgatgtttcg atagtagcta aaacgaatag atattatgct ttagataatg gttatacagt 10740
tctcgtttta tattacggcc taataggatt attatggtat tcatatattc aaattcagac 10800
tgcaaaaaaa ttagagaaga taaatgagtt ggtcctgatg gttgtactct ttatcatcaa 10860
tatctggggg atttatgaag gaaacatggt ttctttaggt ggaaatttca tgattatagc 10920
ttttctttct aaagtaacag ataattattc agaagaatta aaaagttagt agggagctag 10980
tatatgatac caaaggttat tcactattgt tggtttggag gaaaacctct accagaagat 11040
gcaaaaatgt atatcgagtc atggaaaaaa tatttaccga attatgagat aaaagagtgg 11100
aatgaaacaa actttgattt gaattgttgc gattatgtta aagaggcata tcaagaaaag 11160
aaatgggctt ttgtttcgga ttatgcaaga ctatggatta tttataatta cggtggaatt 11220
tattttgata ctgatgtcga gctaataagt tctcctgaac caatcataga aaatggagct 11280
tttttaggat gtgaactcaa tttcgaaaag gaattatcag gtgatactaa ccaaactgaa 11340
cttgttaacc caggtctagg ttttggtgcg gaaccgaaga aggattttta tcgtgagcta 11400
ttaaatttat acgaatcaca acactttatt gataaaaatg gagacctcaa tttggaaaca 11460
atagtagtga aaacaactag actgttgaag gggcatggtt ttacaggtaa tgattctatt 11520
gaacgagttg caggaattaa tatttactct catgaatatt tttgcccaat taactatcgt 11580
acaggtagaa tttcagtcac tgaaaaaact gtatctatac accattacca agaaagttgg 11640
ctttcggctt tagataagat tattaataag atagaacaga gtagaagtgg agttggaact 11700
cttgaataca aagtcagaag aattgtttct aagccattta gaggagttaa tcgtctgaag 11760
aagaagggaa ttttgggatt tctaaaaaaa tgataagact gtggtattct taataggtct 11820
cataagttct tcctaatgat ggtttggttg cttttcatta tagttcttat tggacgtttt 11880
gtctgcattc aaaaagctct ataatctcta cagtagtttt acccactata gaaattatag 11940
agccgaaaaa aatactgtcc aaggctaagg tgcctatcaa atcaaaaatg tccatagaag 12000
aagcgtattc gcatttaaat gcttgtagtc cgagacccaa tgggacttgt tatactatga 12060
acaaaataga aaatgcatat gatttgcaaa ttatcattgc ggcctataat accgaacaat 12120
atataaaaga ttgcttgaat tctgtctgtg gtcaacattc aaaatataaa actttggtga 12180
cagttataaa tgatggttca acagatggaa cagagcatat acttgctggt ataacttcgg 12240
aaaatagggg tggaagcgag ctatgcatca gagttataaa tcaggacaac cgagggcttt 12300
cgcgtgccag aaatgctgct ctttctaata ttgaagcaaa gtatgtaatg tttttagact 12360
cagatgacat tctcccagag aatactattt ctgttatgtt agataaagca tttataactg 12420
atgcagatat tttacaagaa agttggtatt cgtttgatga tgaaaatgtg agtgaaaaca 12480
ttctggagga aaaagttttt gaagttggaa caaaaggata tgtttcggga tatccttggg 12540
gtaaactata caaaagttct gtattaaaaa atttttaatt tccaaaagga tactggtttg 12600

aagatacacc aatcactttt attcttgcag caatgccaat taaagtggta accataaagg 12660
atattgttta tggctatcga ctgaatccaa atggaattac agcaaagtca atctttcata 12720
agaaatcagt tgatactttt tgggttacgg aattatgttt gaacgaacta ccaagattca 12780
aagtgtcata tgatcagcaa tcatatgaat atttattaag acaatcattg atgaatgaag 12840
ccaggataaa gaatcaggga aagaaaatac gagaagcagt atttgtcctg acatcagaat 12900
taatgaaaat ttattttagt ggtttttctt caaaagattc aaagatgaag aaaatagaaa 12960
tagcacttag aaatagacaa tttatccagt ttgaattatc aaaactgtat ttgtaatgat 13020
agattaagtg acacagggag aacagttagt gaatagatac agatatttgt taaaaaacat 13080
aggccttttg accctaagta gtttttcaac caaattactt agtttctttt tggtaccgtt 13140
atataccaat atattatcga ctactcaata tggaacctat gatttattta atactacaat 13200
aggtgtatta ctcccgatcc tcacattgaa tatacaggaa gcggtgatga gattttccat 13260
tgacagtaag tatgatagaa aatcaatcgt gacagtgaca gcaaggttct ttattctttc 13320
aaatttaatt gttattcttg ggctttgggt aaattataca tttgtattta gcgtgattgc 13380
caagcagtat gccatatttt tcttcctgat gtttttatcg cagtcgctat ccgggatgat 13440
aaccatgtat gtcagaggaa tagacaaaat atctgacttg tctttttcaa gtgtaatagc 13500
atctgttatt actatatgct taaatgtttc gttcttagca tttcttcact ggggacttgt 13560
tggatatttt atggccaata taatcggccc gatggttcaa tcactttatt tgattgttaa 13620
agcacatatt ttaggggata ttcatttaga gcaagcatat cagtctgaaa aaaatgaaat 13680
ggttaattat agtaaaccat tgattgcaaa cagcatcgcg tggtgggtaa ataatttttc 13740
tgacagatat atcgttgtga ttttttgtgg gttggctgaa aatggaatat attcagtggc 13800
atcgaaaatt ccttcgatac ttaatatttt tcagacaatt tttaatcagg cgtggacgct 13860
gtctgctgta aaggatttcg accctgagga taaaaacggc tttttcacca atacatataa 13920
agcatataat tgcatgatgg ttgttctatg ctctggaatt attgtattta acaaactgtt 13980
agccagtttt ttgtatgcaa aagactttta tgttgcttgg aaatacgtac catggttaac 14040
aattgcaatc gtattcggag caatgtccgg atatattgga ggaatttttg ctgctgtcaa 14100
ggattctaaa atatttgcga aatcaactgt ttgtggagcg ataactaatg taatattaaa 14160
tttaatactt acacccatta tgggaccatt gggagctgct attgctacgg cagtatccta 14220
ttttgaggta tggatttttta gatatttgca atccaggaga tatattagga ttagggttaa 14280
tatatttagg gatcttatta cttatttctt gctgttttgt cagtcgatta tacttttgat 14340
tgaaatggaa aattcttatt tatatgttct tgaaatcgga atttttattt tgatagtttt 14400
gctatatttt aaggatattc ttttgctatt gaacaaaggt agtaattcaa tcaaaatgaa 14460
gaaaaggggа agtgaattat agtatgaaga tagggataat aacgtggttt acaggctcta 14520
attatggcac taaccttcag gcaatcgctc ttcaatatta cttgagaagt cgtggttatg 14580
ggctctttgt caactgtagt gggtgacgaa aagctaacat ctagagagga ccggataggt 14640
cctttttta tgtatgttca gtgtgatgaa gacacgcttc ttaaagttga taaagtttct 14700
aaaaccgaag cccaagcgtt tgatgtcttt gatcaactta ttagtcgctt caagtttcgc 14760
gtttgaatag tccgtttcta gtgcgttttt gatgtattgc ttgtgtctaa gaaaagtcct 14820
aaagacagtt tgaaaataat gattgacctt gctcctattt tcctctatca gttcaaagaa 14880
ctcatctact ctcttctcct gaaagtgaaa aaacaaaagc tgataaagtg tatagtagtc 14940
agtaagctct tttgaaaaga ctagtgtctt cgcaacaact tcatgtggtg ctaaagtttg 15000
gcggaaagtc tttgaataaa aagaattgag agatagttta cagctgtcct tttggaagag 15060
tcgccagtga tttttcaagg ctcgatagggg tagtgacttc ttatcgaact ggttcatgat 15120
tgcaattctt gtctttaaaa aggcaagtcc aaggtgctgg atgatgtgga aacgatcaag 15180
aacgattttg acgtttggaa agagtctgcg ggctagtggg atataggctc cagacatatc 15240
cattgtgata aactgtacct gttgtcggac tttcaatgga tacttcaaaa agtagtttcg 15300
tatagtagtt tggcggcgat tatcaaggat ggttatgagt tcgtttgtct cataattctg 15360
cgccacaaaa gccaattccc ctttcttgaa cccaaactca tcccaggaca taacagcagg 15420
gagtttgtca taatgttcct tgaaagtaaa ctgatcaagc ttacgataga cagtggacgt 15480
cgacacgcga agtcttcttg caatatcagt tagtgacact ttctcagtta ggagttgtgt 15540
aactttttgt cggactagat tggagatttg gcagtttttc tcaacgatag atgtctcagc 15600
caccccttact ctcctacaac ttttacactg gaaacgacgt tttttcagac gtagtagagt 15660
tggcgttccc gcttgctcga gaagagagat tttagagttt ttttgaaagt catacttgat 15720
catctttcca tggcaatgag gacatgatgg tgaagggtaa tcaagttttg cttgaatctc 15780
gatatgagtg tcagtttcaa aaacaagtga aatcttgata ttttggtctt tgattccgat 15840
taattctgtg ttattcttaa taagtttcat aagttcttcc taatgatggt ttggttgctt 15900
ttcattatag ttcttatggg actttttgtg tacactcaaa aagctctata atcctacag 15960
tagttttacc cactacagaa attatagagc caatatatct cctgtctatt tttatgctac 16020

ttttgggtta gc

<210> 2
<211> 906
<212> ADN
<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 2

```
aaggagagat tcgtgaaacc taaaatactt gtacttatgg caacctataa tggaggaaaa     60
tacttacgag agcaattaga tagtgttttt ttacaaaaaa atgtggatat tactgtcctg    120
gttcgtgacg atggttcaat tgacaatacg tgtgctattc ttgatgaata tagtaagaga    180
tacaacttaa tatggtattc agggcaacat ctaaatgttg cgaatggatt ttataatttg    240
atggaagaag cagtcaaaat ggattttgac tacttcgctt tctgtgatca ggatgatgtt    300
tgggatacag ataaactttc catcggagtt tctgcaattt gtagttttaa tgaacctgct    360
ttatattatt gtggtcaaag attggccgac ggtaatttaa attttatagc aaatcatgaa    420
ctcaacacag aacggacact ccatacaagg tttatccttt ctgattttgc tggttgtaca    480
ggagttttca ataaatcgtt attaaaggaa gttgttagct atagaccgaa gtatatgttg    540
atgcatgata catggatatt aaaagtctgt ttggctctag gtggacaggt tattattgat    600
acaagaccgc atatgtatta taggcaacat ggtggtaata cagttggtct tggaagaagt    660
ctatctgcat acttcaaaca ggtaaaacag tatataactg aatataaagt ggaaccacag    720
atgaaggaac ttctcttagg atatggtgat agaattattt cggagtatgc tgtaattgca    780
aatgcttgtt gtaattataa aacggatcgt gaggcacgta ctttttttatt aaatagaaat   840
aatgttgatt tttgcacgat gggattaaat atcaccttta aattaaaagt tctattaaat    900
aaatta                                                               906
```

<210> 3
<211> 1032
<212> ADN
<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 3

```
atggaggaag agtttttgct ttttagtatt ataatacctg tttttaatgt cgaaaaatat     60
cttgaggagt gccttctctc gattataggg cagactgatg aaatatctga aggatgtgaa    120
ataattctta ttaatgacgg gtcaacagat gatagtgcga aaatttgtga tgagtatgag    180
cgaaaatatc ctgaattgat aaaggtattt cataggtcaa atcatggttt gcttcttaca    240
cgaaggtttg gatatcaaca tgccgtagga agatacataa ttaattgtga ctcagatgat    300
tcgttggaac cgattgcact tgaggtgctc aaagacgcaa tcgtcgaata caacaaccca    360
gatgttatta tatttaacca caatacatat aaaaatggtg taaaggagat tgcatacaat    420
aacattttta cagagtctgt ttctgcccag atagataagc tagatgtgtt gaaagagttt    480
ctgactggaa atcgtattaa tagcgtttgt ggtgcaattt gtaaaaagga ttgtattgat    540
ataaatagag actataataa atataaaggt cttaataatg gagaagatag ccttcaaaag    600
attgaacaat tcaaaagtgc gaacacgttt gcatatataa ataaacctct ctataattat    660
agggcaggat cgggtatgac cacaaaattt gatcgaaatt attttaaatc ttttagaata    720
gttctggatg aaattcaaaa agaacgagaa atgtgggatt ttcctgatgt agatagatat    780
ttttcaatta aagttttgtc tattgctgga agagcaatca cacagtcaag atacaattgt    840
tgggagaata aaagcgagca aataagatac ttgcatgata ttcgtaatga tgactactlt    900
aaaaaagcag tgcttcaatt ggctacaata aggaaatatc ttcagaaaga ccatatttta    960
ctaataaaga tgttggataa gggtttgatt cgtcttatag ttttgatgtt ggatattaaa   1020
aataagatag gc                                                       1032
```

<210> 4
<211> 1140
<212> ADN
<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 4

```
atgaatagta tagataagaa gtatcgtatt aaacttgata cgttaatatt tttgattttt     60
attatgttag caactttcaa ctattcgatg gagttatcaa tagttggaaa tccattcagg    120
caagtgattc ttgtactgat gctcatatta ttgttgttta caatcatcct taagaaatac    180
acaataaaaa aaatgattgt atttattacg gctatagtgt atggattagt taactatcga    240

gtttcaggtt atacagactt atttatttta ttgcttgcgg cgtatgttgc ggatcaagta    300
gattttaata acgtgttaaa agttctattt tgggaaaaat tagtgatatt tttatcgctt    360
aatatatttt cagtgcttgg tgtaatagag atgactaaat tctccatcaa taagtatcta    420
tccattgtag aagcatatgc tccaggatat gtttcttcga atgtatatgg ctgccaagca    480
ggagttttat ttttacttta tttatcaatt aatcggtata aattgacaaa gttaaaagtt    540
ctattagttt ggtttttgag tgttttagta tacattattt gtagatcaag gacagagcta    600
atcttagtat cagtaacaac agttctttta ttaatatgta ataatccaaa aaactttaat    660
aaagttaaga ggatactctc gtggggatat ccatctattt tggttttaaa ttttgggtta    720
atatatactt tttcaatact cggttacggt aatcccatta tgagcactgt aaatgatgta    780
ttattcaatg ggagaattgg cttggctctc atgaatttta atacttatgg tatttcatta    840
tttggctccc caattgatgt ttcgatagta gctaaaacga atagatatta tgctttagat    900
aatggttata cagttctcgt tttatattac ggcctaatag gattattatg gtattcatat    960
attcaaattc agactgcaaa aaaattagag aagataaatg agttggtcct gatggttgta   1020
ctctttatca tcaatatctg ggggatttat gaaggaaaca tggtttcttt aggtggaaat   1080
ttcatgatta tagcttttct ttctaaagta acagataatt attcagaaga attaaaaagt   1140
```

<210> 5
<211> 810
<212>ADN
<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 5

```
tatatgatac caaaggttat tcactattgt tggtttggag gaaaacctct accagaagat     60
gcaaaaatgt atatcgagtc atggaaaaaa tatttaccga attatgagat aaaagagtgg    120
aatgaaacaa actttgattt gaattgttgc gattatgtta aagaggcata tcaagaaaag    180
aaatgggctt ttgtttcgga ttatgcaaga ctatggatta tttataatta cggtggaatt    240
tattttgata ctgatgtcga gctaataagt tctcctgaac caatcataga aaatggagct    300
tttttaggat gtgaactcaa tttcgaaaag gaattatcag gtgatactaa ccaaactgaa    360
cttgttaacc caggtctagg ttttggtgcg gaaccgaaga aggattttta tcgtgagcta    420
ttaaatttat acgaatcaca acactttatt gataaaaatg gagacctcaa tttggaaaca    480
atagtagtga aaacaactag actgttgaag gggcatggtt ttacaggtaa tgattctatt    540
gaacgagttg caggaattaa tatttactct catgaatatt tttgcccaat taactatcgt    600
acaggtagaa tttcagtcac tgaaaaaact gtatctatac accattacca agaaagttgg    660
ctttcggctt tagataagat tattaataag atagaacaga gtagaagtgg agttggaact    720
cttgaataca aagtcagaag aattgtttct aagccattta gaggagttaa tcgtctgaag    780
aagaagggaa ttttgggatt tctaaaaaaa                                     810
```

<210> 6
<211> 750
<212> ADN
<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 6

```
gttcttccta atgatggttt ggttgctttt cattatagtt cttattggac gttttgtctg     60
cattcaaaaa gctctataat ctctacagta gttttaccca ctatagaaat tatagagccg    120
aaaaaaatac tgtccaaggc taaggtgccc atcaaatcaa aaatgtccat agaagaagcg    180
tattcgcatt taaatgcttg tagtccgaga cccaatggga cttgttatac tatgaacaaa    240
atagaaaatg catatgattt gcaaattatc attgcggcct ataataccga acaatatata    300
aaagattgct tgaattctgt ctgtggtcaa cattcaaaat ataaaacttt ggtgacagtt    360
ataaatgatg gttcaacaga tggaacagag catatacttg ctggtataac ttcggaaaat    420
aggggtggaa gcgagctatg catcagagtt ataaatcagg acaaccgagg gctttcgggt    480
gccagaaatg ctgctctttc taatattgaa gcaaagtatg taatgttttt agactcagat    540
gacattctcc cagagaatac tatttctgtt atgttagata aagcatttat aactgatgca    600
gatattttac aagaaagttg gtattcgttt gatgatgaaa atgtgagtga aaacattctg    660
gaggaaaaag tttttgaagt tggaacaaaa ggatatgttt cgggatatcc ttggggtaaa    720
ctatacaaaa gttctgtatt aaaaaatttt                                     750
```

<210> 7
<211> 435
<212> ADN
<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 7

```
tttccaaaag gatactggtt tgaagataca ccaatcactt ttattcttgc agcaatgcca     60
attaaagtgg taaccataaa ggatattgtt tatggctatc gactgaatcc aaatggaatt    120
acagcaaagt caatctttca taagaaatca gttgatactt tttgggttac ggaattatgt    180
ttgaacgaac taccaagatt caaagtgtca tatgatcagc aatcatatga atatttatta    240
agacaatcat tgatgaatga agccaggata aagaatcagg gaaagaaaat acgagaagca    300
gtatttgtcc tgacatcaga attaatgaaa atttatttta gtggtttttc ttcaaaagat    360
tcaaagatga agaaaataga aatagcactt agaaatagac aatttatcca gtttgaatta    420
tcaaaactgt atttg                                                     435
```

<210> 8
<211> 1452
<212> ADN
<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 8

```
gtgagacagg gagaacagtt agtgaataga tacagatatt tgttaaaaaa cataggcctt     60
ttgaccctaa gtagtttttc aaccaaatta cttagtttct ttttggtacc gttatatacc    120
aatatattat cgactactga atatggaacc tatgatttat ttaatactac aataggtgta    180
ttactcccga tcctcacatt gaatatacag gaagcggtga tgagattttc cattgacagt    240
aagtatgata gaaaatcaat cgtgacagtg acagcaaggt tctttattct ttcaaattta    300
attgttattc ttgggctttg ggtaaattat acatttgtat ttagcgtgat tgccaagcag    360
tatgccatat ttttcttcct gatgttttta tcgcagtcgc tatccgggat gataaccatg    420
tatgtcagag gaatagacaa aatatctgac ttgtcttttt caagtgtaat agcatctgtt    480
attactatat gcttaaatgt ttcgttctta gcatttcttc actggggact tgttggatat    540
tttatggcca atataatcgg cccgatggtt caatcacttt atttgattgt taaagcacat    600
attttagggg atattcattt agagcaagca tatcagtctg aaaaaaatga aatggttaat    660
tatagtaaac cattgattgc aaacagcatc gcgtggtggg taaataattt ttctgacaga    720
tatatcgttg tgatttttg tgggttggct gaaaatggaa tatattcagt ggcatcgaaa    780
attccttcga tacttaatat ttttcagaca atttttaatc acgcgtggac gctgtctgct    840
gtaaaggatt tcgaccctga ggataaaaac ggctttttca ccaatacata taaagcatat    900
aattgcatga tggttgttct atgctctgga attattgtat ttaacaaact gttagccagt    960
tttttgtatg caaaagactt ttatgttgct tggaaatacg taccatggtt aacaattgca   1020
atcgtattcg gagcaatgtc cggatatatt ggaggaattt ttgctgctgt caaggattct   1080
aaaatatttg cgaaatcaac tgtttgtgga gcgataacta atgtaatatt aaatttaata   1140
cttacaccca ttatgggacc attgggagct gctattgcta cggcagtatc ctattttgag   1200
gtatggattt ttagatattt gcaatccagg agatatatta ggattagggt taatatattt   1260
agggatctta ttacttattt cttgctgttt tgtcagtcga ttatactttt gattgaaatg   1320
gaaaattctt atttatatgt tcttgaaatc ggaattttta ttttgatagt tttgctatat   1380
tttaaggata ttcttttgct attgaacaaa ggtagtaatt caatcaaaat gaagaaaacg   1440
ggaagtgaat ta                                                       1452
```