

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 699**

51 Int. Cl.:

**A23C 19/082** (2006.01)

**A23C 19/11** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.08.2013 PCT/US2013/056169**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2014 WO14031842**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2013 E 13759070 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2887815**

54 Título: **Queso procesado con componentes lácteos cultivados y método de fabricación**

30 Prioridad:

**22.08.2012 US 201261692129 P**

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

**16.08.2018**

73 Titular/es:

**KRAFT FOODS GROUP BRANDS LLC (100.0%)  
200 E. Randolph Street, Suite 7600  
Chicago, IL 60601, US**

72 Inventor/es:

**ZHENG, ZUOXING;  
CHINWALLA, AMMAR N.;  
MARCUS-JOHNSON, CHRISTINE D. y  
REDDY, DIVYA SHREE**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 678 699 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**

Queso procesado con componentes lácteos cultivados y método de fabricación

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la ventaja de la solicitud provisional de Estados Unidos número 61/692.129, presentada el 22 de agosto de 2012.

10 Presentación del listado de secuencias

El listado de secuencias asociado con esta solicitud se presenta en formato electrónico por medio de la web EFS y se incorpora en la presente memoria descriptiva en su totalidad. El nombre del archivo de texto que contiene la lista de secuencias es "Sequence Listing 1410.131457". El tamaño del archivo de texto es de 46 kB, y el archivo de texto se creó el 21 de agosto de 2013.

**Campo**

20 La presente solicitud se refiere de modo general a métodos de fabricación de composiciones de queso procesado y, más especialmente, a métodos de fabricación de composiciones de queso procesado que contienen componentes lácteos cultivados.

**Antecedentes**

25 El queso procesado, ampliamente disponible en forma de lonchas y bloques, se ha convertido en uno de los productos de queso más populares. Los productos de queso procesado son especialmente apreciados por los niños. El queso procesado se prepara convencionalmente mediante calentamiento, trituración y/o mezclado de una o más variedades de quesos naturales que contienen grasa láctea, tales como, por ejemplo, queso Cheddar, queso Colby, queso suizo, queso Brick, queso Muenster, queso pasta filata, cuajada lavada, y queso coágulo granular, por  
30 mencionar solo algunos tipos. El queso resultante se mezcla a continuación con otros productos lácteos, tales como leche deshidratada desnatada y sólidos de lactosuero, y sales emulsionantes, tales como fosfato disódico, a temperaturas que son suficientemente elevadas para pasteurizar el queso y para producir un material de queso fluido homogéneo y que se puede bombear que se puede conformar en láminas, lonchas u otras formas deseadas.

35 A menudo es deseable prolongar el período de validez de los alimentos, tales como queso procesado, y/o aumentar la estabilidad microbiológica de tales alimentos. Al aumentar la cantidad de tiempo que un alimento es estable, los procesadores pueden mitigar las pérdidas de inventario debidas a productos alimenticios que se han deteriorado. Los métodos anteriores, tales como el uso de envasado, conservantes y/o parámetros de almacenamiento específicos (p. ej., refrigeración), han sido utilizados para evitar el deterioro.

40 En particular, *Listeria monocytogenes* y *C. botulinum* pueden, en algunos casos, ser problemáticos con alimentos como la leche cruda, quesos (especialmente las variedades poco curadas), helado, verduras crudas, carne cruda fermentada, embutidos, carne de ave cruda y cocinada, carnes crudas (de todos los tipos), y pescado crudo y ahumado. La capacidad de estos patógenos para crecer, en algunos casos, a temperaturas de tan solo 3 °C  
45 permite la multiplicación en alimentos refrigerados.

Además, aunque se desea proporcionar un período de validez más amplio a los alimentos, tales como el queso procesado, también ha habido un mayor deseo de proporcionar alimentos que contengan una mayor cantidad de ingredientes naturales. A este respecto, puede ser deseable proporcionar alimentos que incluyan solo  
50 ingredientes naturales o eliminar si no los materiales artificiales. Por ejemplo, a menudo, el queso procesado utiliza conservantes tales como ácido sórbico para mejorar la seguridad y el período de validez del alimento. Puede ser deseable incorporar conservantes y/o agentes antimicrobianos naturales mientras se mantienen y/o mejoran las características del queso procesado.

55 El documento WO2011/146916 describe un proceso para elaborar un queso cheddar que tiene una buena capacidad de fusión mediante el suministro de un ingrediente enriquecido con EPS con un ingrediente de leche de base.

**Sumario**

60 Se proporciona un método de producción de un queso procesado que tiene agentes antimicrobianos naturales. El método incluye fermentar un medio lácteo líquido con una cepa de *Lactococcus lactis* para producir un componente lácteo cultivado que incluye nisina y exopolisacárido. El componente lácteo cultivado se mezcla a continuación con un queso natural o mezcla de quesos naturales y uno o más emulsionantes para producir un queso procesado que tiene de aproximadamente 8 a aproximadamente 25 por ciento de proteína y de aproximadamente 10 a  
65 aproximadamente 20 por ciento de grasa. El método es eficaz para producir queso procesado una cantidad de nisina, eficaz para evitar la formación de la toxina determinada por la toxina *C. botulinum* determinada por bioensayo

de toxina en ratones, en el queso procesado a los niveles de proteína y grasa del mismo durante aproximadamente 9 días a 30 °C (a 86 °F). El método también es eficaz para producir queso procesado con una cantidad de exopolisacárido eficaz para aumentar la fusión del queso procesado y aumentar la firmeza del queso procesado con respecto a un queso procesado sin nisina ni exopolisacárido. En algunos enfoques, la nisina incluye nisina A.

5 En otros enfoques, la nisina y el exopolisacárido en el componente lácteo cultivado del método se obtienen a partir de la fermentación de la misma cepa de *Lactococcus lactis* en el medio lácteo líquido. La cepa *Lactococcus lactis* puede ser una cepa de *Lactococcus lactis* aislada que tiene todas las características identificativas de la cepa *Lactococcus lactis* de número ATCC PTA-120552. El componente lácteo cultivado utilizado en el método también  
10 puede incluir de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 ppm de nisina y de aproximadamente 100 a aproximadamente 2.000 ppm del exopolisacárido. El queso procesado puede incluir de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 por ciento en peso del componente lácteo cultivado.

15 El método puede incluir la fermentación de la cepa *Lactococcus lactis* número ATCC PTA-120552 realizada en un medio lácteo líquido 2 veces o 5 veces concentrado a una temperatura de aproximadamente 25 a aproximadamente 35 °C y un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 durante de aproximadamente 15 a aproximadamente 48 horas. En algunos enfoques, el medio lácteo líquido concentrado es una leche concentrada que tiene un total de sólidos de aproximadamente 5 a aproximadamente 36 por ciento, de aproximadamente 1 a aproximadamente 14 por ciento, y de aproximadamente 0 a aproximadamente 16 por ciento de grasa.

20 En otros enfoques, el método es eficaz de modo que el queso procesado está exento de conservantes artificiales seleccionados del grupo que consiste en ácido sórbico, sorbato potásico, nitritos y mezclas de los mismos.

25 En algunos enfoques, el componente lácteo cultivado del método incluye nisina A y una cepa bacteriana que tiene al menos un gen de un clúster de genes productores de nisina con homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las Id. de sec. 9 a 19 y al menos un gen de un clúster de genes productores de exopolisacárido con homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las Id. de sec. 21 a 33.

30 En otros enfoques, el al menos un gen de un clúster de genes productores de nisina y el al menos un gen del clúster de genes productores de exopolisacárido en el método son de la misma cepa de *Lactococcus lactis*.

### Breve descripción de los dibujos

35 La Fig. 1 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra la producción de un componente lácteo cultivado ilustrativo producido a partir de un líquido lácteo concentrado;

la Fig. 1A es un diagrama de flujo de proceso alternativo;

40 la Fig. 2 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra una segunda forma de producción de un componente lácteo cultivado ilustrativo producido a partir de ingredientes lácteos en polvo;

la Fig. 3 ilustra perfiles de sabor para el queso procesado con y sin componentes lácteos cultivados;

45 las Figs. 4A-D son fotografías que muestran comparaciones de diversos quesos procesados con y sin componentes lácteos cultivados;

las Figs. 5A-C son fotografías que muestran comparaciones de diversos quesos procesados con y sin componentes lácteos cultivados;

50 la Fig. 6 es un gráfico que muestra las mediciones de firmeza para el queso procesado con componentes lácteos cultivados al 8 por ciento en comparación con un control sin componentes lácteos cultivados;

55 la Fig. 7 es un gráfico que muestra las mediciones de consistencia para el queso procesado con componentes lácteos cultivados al 8 por ciento en comparación con un control sin componentes lácteos cultivados;

la Fig. 8 es un gráfico que muestra las mediciones de firmeza para queso procesado con componentes lácteos cultivados al 8 por ciento en comparación con un control sin componentes lácteos cultivados;

60 la Fig. 9 es un gráfico que muestra las mediciones de consistencia de queso procesado con 8 por ciento de componentes lácteos cultivados en comparación con un control sin componentes lácteos cultivados;

la Fig. 10 es un gráfico que muestra los resultados de un análisis de tipificación multilocus de secuencias (MLST) comparativo de cepas productoras de nisina;

65 la Fig. 11 es un gráfico que muestra los resultados de análisis de tipos de fagos de cepas productoras de nisina;

la Fig. 12 incluye resultados del análisis de Riboprinter de diversas cepas de *Lactococcus lactis*;

la Fig. 13 es un diagrama que compara los genes relacionados con EPS de diversas bacterias de ácido láctico;

5 la Fig. 14 muestra la secuencia de aminoácidos de nisina A; y

la Fig. 15 (A) es una imagen de microscopía confocal de barrido que muestra la ausencia de EPS antes de la inoculación y fermentación con cepa 329 de *L. lactis* y la Fig. 15 (B) es una imagen de microscopía confocal de barrido que muestra la presencia de EPS tras la fermentación con cepa 329 de *L. lactis*.

10

### Descripción detallada

La presente solicitud se refiere de modo general a métodos de producción de queso procesado que incluyen, entre otros aspectos, agentes antimicrobianos naturales y agentes modificadores de la textura naturales. En una forma, los agentes antimicrobianos naturales se incorporan en el queso procesado mediante componentes lácteos cultivados o componentes lácteos cultivados concentrados, que incluyen un agente antimicrobiano natural y/o un cultivo capaz de producir un agente antimicrobiano natural en condiciones de fermentación apropiadas. Como se utiliza en la presente memoria, los términos “componente lácteo cultivado” o “componente lácteo cultivado concentrado” se refieren, de modo general, a sustratos de leche cultivados o derivados de los mismos que han experimentado, en algunos enfoques, concentración y fermentación con cultivos productores de agentes antimicrobianos seleccionados en condiciones eficaces para producir agentes antimicrobianos, salvo que se identifiquen de forma específica como no incluyentes de agentes antimicrobianos cultivados. Como se utiliza en la presente memoria, “agente antimicrobiano natural” se refiere a un componente con actividad antimicrobiana que es producido por un organismo, tal como un cultivo bacteriano durante un proceso de fermentación.

15

20

25

30

El componente lácteo cultivado utilizado en el método de la presente invención incluye un sustrato lácteo fermentado con un cultivo productor de agente antimicrobiano que es una cepa de *Lactococcus lactis*. En algunos enfoques, el sustrato lácteo es un líquido lácteo, tal como leche o un líquido lácteo o sustrato lácteo concentrado, tal como un sustrato de leche concentrado de 2 a 5 veces. En un aspecto, el cultivo productor de agente antimicrobiano que es una cepa de *Lactococcus lactis* es un cultivo productor de nisina. En una forma particular, la nisina producida por el cultivo es nisina A. En un enfoque, los quesos procesados producidos mediante el método de la presente invención incluyen de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 ppm de nisina, en otros enfoques, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 ppm de nisina, en otros enfoques, de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 ppm de nisina y, en otros enfoques, de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 ppm de nisina.

35

40

45

El componente lácteo cultivado utilizado en el método de la presente invención también incluye exopolisacárido (EPS). En un aspecto, el EPS se produce durante la fermentación del sustrato de leche en las mismas condiciones y con el mismo medio que se utiliza para producir nisina. En otro aspecto, el EPS se produce mediante el cultivo productor de agente antimicrobiano que es una cepa de *Lactococcus lactis* y, en algunos enfoques, a partir de la misma cepa bacteriana que se utiliza para producir nisina. En este sentido, cuando el componente lácteo cultivado se utiliza en los métodos para producir quesos procesados en la presente invención, el queso procesado incluye nisina (tal como nisina A) y EPS obtenidos de la misma fermentación y, en algunos enfoques, la misma cepa bacteriana. Junto con la nisina descrita anteriormente, se espera que el componente lácteo cultivado incluya de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2 por ciento de exopolisacárido, y el queso procesado final incluya, además de la nisina, de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000 ppm del exopolisacárido.

50

55

60

Se ha descubierto inesperadamente que un queso procesado producido mediante el método de la presente invención, incluido el componente lácteo cultivado de la presente invención que incluye tanto agentes antimicrobianos naturales (tales como nisina) como exopolisacárido a partir de la misma fermentación y/o la misma cepa bacteriana tiene propiedades antimicrobianas mejoradas, mejor capacidad en estado fundido, y una textura más firme en comparación con el queso procesado con la misma formulación salvo por los conservantes artificiales y/u otros tipos de agentes antimicrobianos naturales anteriores. Al mismo tiempo, el queso procesado producido mediante el método de la presente memoria que incluye el componente lácteo cultivado único también presenta una firmeza que recuerda a la del queso natural. No se esperaba que tanto las mayores propiedades de fusión como una mayor firmeza pudieran obtenerse al mismo tiempo en un queso procesado. Según un enfoque, los quesos procesados producidos mediante el método de la presente invención presentan una firmeza (módulo de Young) de aproximadamente 1.500 a aproximadamente 2.500 Pa y, al mismo tiempo, presentan una consistencia de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 70.000 Pa/segundo. En otras propuestas, el queso procesado producido mediante el método de la presente invención con los componentes lácteos cultivados también presenta un aumento en la fusión de aproximadamente 20 a aproximadamente 75 % sobre el mismo queso procesado pero sin el componente lácteo cultivado o con ácido sórbico u otro conservante artificial en lugar del componente lácteo cultivado. Como se utiliza en la presente memoria, queso natural se refiere a queso no pasteurizado elaborado cuajando leche u otro líquido lácteo utilizando alguna combinación de cuajo (o sustituto de cuajo) y acidificación. El queso natural utilizado en el queso procesado descrito en la presente memoria puede ser recién preparado o envejecido.

65

Como se describe más adelante, los agentes antimicrobianos anteriores solían ser menos eficaces en el contexto de un queso procesado con altos niveles de proteína y grasa debido a que se cree que los niveles de proteína y grasa combinados en el queso procesado, en algunos casos, con niveles inferiores de humedad tienden a

proteger y/o a evitar la inhibición de diversos patógenos por parte de las formas comerciales de nisina y otros agentes antimicrobianos naturales. Inesperadamente, se descubrió que los agentes antimicrobianos naturales de los componentes lácteos cultivados en el método de la presente invención inhiben de forma eficaz *C. botulinum* y otros patógenos a un nivel no hallado en el caso de los agentes antimicrobianos naturales anteriores.

Anteriormente, se esperaba que cuando se mejoraba la capacidad de fusión del queso procesado, se obtendría una disminución de la firmeza. Es decir, anteriormente se esperaba que hubiera una relación inversa entre la fusión y la firmeza. Como se ha mencionado anteriormente, los quesos procesados producidos mediante el método de la presente invención, por otro lado, logran una mejora tanto en estado fundido como de textura/firmeza al mismo tiempo cuando se utilizan los componentes lácteos cultivados. Esta doble mejora en la fusión y la firmeza al mismo tiempo tendía a ser opuesta a estas tendencias en las aplicaciones de queso procesado anteriores.

Como se describe en la presente memoria, el término unidad de actividad ("AU") puede usarse para describir la actividad biológica del agente antimicrobiano natural en el componente lácteo cultivado y el queso procesado en el que se incorpora el agente antimicrobiano. Debe entenderse que la actividad biológica puede expresarse también en unidades internacionales ("UI"), de manera que AU y UI se pueden usar indistintamente. En algunos enfoques, los componentes lácteos cultivados de la presente descripción y los quesos procesados preparados con los mismos pueden tener una actividad de nisina en el queso procesado de aproximadamente 40 a aproximadamente 400 UI/gramo y, en otros enfoques, de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 UI/gramo.

En el queso procesado producido mediante el método de la presente invención se pueden incluir uno o más agentes antimicrobianos naturales diferentes. En una forma, el queso procesado producido mediante el método de la presente memoria contiene una cantidad suficiente de agente antimicrobiano natural de manera que el queso procesado no contiene o está exento de conservantes artificiales, tales como ácido sórbico, sorbato potásico y similares. Como se utiliza en la presente memoria, las frases "no contiene", "está libre de" o "prácticamente libre de" significan menos de aproximadamente 0,5 %, en otros enfoques, menos de aproximadamente 0,1 % y, en algunos casos, menos de aproximadamente 0,05 % y, en otros casos, ninguno. En algunos enfoques, el queso procesado producido mediante el método de la presente invención incluye una cantidad de agente antimicrobiano natural eficaz para evitar la formación de toxinas durante al menos aproximadamente 9 días cuando el queso procesado se almacena a aproximadamente 30 °C (a aproximadamente 86 °F). El queso procesado producido mediante el método de la presente invención también incluye componente lácteo cultivado en una cantidad eficaz para evitar un crecimiento superior a 1 log de crecimiento de *Listeria monocytogenes* durante al menos aproximadamente 4 semanas, en otro aspecto al menos aproximadamente 8 semanas, en otro aspecto al menos aproximadamente 12 semanas, en otro aspecto al menos aproximadamente 16 semanas, en otro aspecto al menos aproximadamente 20 semanas, en otro aspecto al menos aproximadamente 24 semanas y, en otro aspecto, al menos aproximadamente 28 semanas, durante un almacenamiento a una temperatura de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 °C.

El agente antimicrobiano natural se puede producir por fermentación mediante el uso de una cepa productora de agente antimicrobiano de bacterias de ácido láctico. Como se utiliza en la presente memoria, el término "bacterias de ácido láctico" se refiere, de modo general, a bacterias gram positivas que generan ácido láctico como metabolito principal de la fermentación de carbohidratos. La bacteria de ácido láctico es una cepa productora de agentes antibacterianos de *Lactococcus lactis* o, en propuestas alternativas que no se reivindican, *Brevibacterium linens*.

El agente antimicrobiano natural comprende nisina y, en algunos enfoques, nisina A. La nisina es un péptido policíclico inhibidor con 34 residuos de aminoácidos. Contiene los aminoácidos no comunes lantionina, metillantionina, deshidroalanina y ácido deshidroaminobutírico. Estos aminoácidos se sintetizan por medio de modificaciones posttraduccionales. En estas reacciones, un 57-mero sintetizado por ribosomas se convierte en el péptido final. Los aminoácidos insaturados se originan a partir de serina y treonina.

La nisina se puede obtener mediante el cultivo de bacterias productoras de nisina en sustratos naturales, incluida la leche. La nisina se ha incluido en productos alimenticios para prolongar la vida útil segura mediante la supresión de las bacterias de descomposición y patógenas gram positivas. Debido a su actividad altamente selectiva, también se puede emplear como agente selectivo en medios microbiológicos para el aislamiento de bacterias gram negativas, levaduras y hongos. Dos agentes antimicrobianos comercialmente disponibles que contienen nisina Nisaplin® y Novasin™ (ambos de Daniso A/S Dinamarca). De forma típica, la nisaplina contiene menos de aproximadamente 3,0 % en peso de nisina, consistiendo el resto en NaCl, proteínas, carbohidratos y humedad. Cuando se hace referencia a un componente de nisina en la presente memoria, el componente puede incluir no solo nisina, sino también otros ingredientes, tales como vehículos, sales, proteína, carbohidratos, y metabolitos que resultan del proceso de fermentación. Como se muestra en los ejemplos y se indica más adelante, las fuentes comercialmente disponibles de nisina no proporcionan el mismo nivel de supresión de bacterias de descomposición y patógenas en el contexto de queso procesado que los componentes lácteos cultivados de la presente descripción.

En un aspecto, los componentes lácteos cultivados elaborados mediante los métodos descritos en la presente memoria incluyen nisina A y/o el cultivo productor de nisina incluye un cultivo productor de nisina A. La nisina A tiene un peso molecular de aproximadamente 3.351,5 Da y la secuencia de aminoácidos de Id. de sec. n.º 1. Sin

embargo, se debe entender que se pueden también utilizar otros agentes antimicrobianos naturales. Por ejemplo, pueden incluirse otras formas de nisina, incluidas nisina Z, nisina Q, nisina F, y nisina F. También se pueden incluir otras bacteriocinas, tales como las bacteriocinas de Clase I, las bacteriocinas de Clase II, las bacteriocinas de Clase III y las bacteriocinas de Clase IV. También se pueden incluir otros agentes antimicrobianos naturales, incluidos agentes antifúngicos de origen natural tales como, por ejemplo, natamicina (producida por *Streptomyces natalensis*) y polilisinina (producida por determinadas especies de *Streptomyces*).

Además, en el método de la presente invención se utiliza una cepa de *Lactococcus lactis* que produce agentes antimicrobianos naturales. Las cepas bacterianas son cepas productoras de agentes antibacterianos de bacterias de ácido láctico, tales como, por ejemplo, cepas productoras de nisina de *Lactococcus lactis*, o, en una realización no reivindicada, *Brevibacterium linens*.

El componente lácteo cultivado comprende un componente de nisina y/o incluye un cultivo capaz de producir un componente de nisina en el intervalo de aproximadamente 30 a aproximadamente 90 ppm en peso del medio de fermentación.

El agente antimicrobiano natural se puede proporcionar cultivando las bacterias productoras de agentes antimicrobianos en condiciones de fermentación adecuadas en un sustrato lácteo. El sustrato lácteo puede incluir, por ejemplo, leche, nata, lactosuero u otro polvo o líquido que contiene materia láctea. El sustrato lácteo puede también comprender dextrosa, jarabe de maíz u otros carbohidratos suplementados con otros nutrientes para el crecimiento bacteriano, con o sin un neutralizante ácido tal como carbonato cálcico.

En algunas formas, la leche puede estar en forma de leche cruda o un producto de leche concentrado, tal como un producto de leche concentrado al menos aproximadamente 2 veces, en otro aspecto un producto de leche concentrado hasta aproximadamente 5 veces. De forma típica, la base de leche contendrá más de aproximadamente 3 por ciento de lactosa y una fuente de nitrógeno. La base puede producirse a partir de polvos hidratados o derivados de líquidos lácteos frescos, tales como leche desnatada, leche al dos por ciento, leche entera y similares. En un enfoque, el sustrato lácteo inicial incluye leche concentrada que tiene un contenido de sólidos total de aproximadamente 5 a aproximadamente 36, un contenido de proteína de aproximadamente 1 a aproximadamente 14 por ciento, un contenido de grasa de aproximadamente 0 a aproximadamente 16 por ciento, y un contenido de humedad de aproximadamente 64 a aproximadamente 95 por ciento.

Cuando el componente lácteo cultivado se utiliza en la producción de queso procesado, se ha descubierto que es deseable mantener un bajo nivel de humedad en el sustrato lácteo para reducir los costes incrementados asociados con la eliminación de humedad del componente lácteo cultivado antes de su inclusión en el producto de queso procesado. Además, determinados componentes del componente lácteo cultivado pueden ser inestables y pueden degradarse o dañarse de otro modo durante un proceso de eliminación de humedad. Por ejemplo, se cree que el componente EPS del componente lácteo cultivado es relativamente inestable y puede ser dañado por técnicas de eliminación de humedad, tales como deshidratación por pulverización, evaporación, y similares. Sin embargo, el componente lácteo cultivado que incluye agentes antimicrobianos cultivados puede adoptar una variedad de formas tales como líquido y/o polvo, si se desea para una aplicación particular.

La nisina A y el cultivo que produce exopolisacáridos utilizados en la presente invención es la cepa 329 de *Lactococcus lactis* ss. *lactis*. El 21 de agosto de 2013, la cepa 329 se depositó en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd, Manassas, VA 20110 con el número de registro dado PTA-120552. El depósito se realizó bajo las condiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para fines de procedimientos de patentes.

Se ha descubierto que la cepa 329 de *Lactococcus lactis* tiene un perfil genético y fagocítico único en comparación con otras cepas productoras de nisina de bacterias de ácido láctico. Ventajosamente, también se encontró que la cepa 329 es capaz de crecer en sustratos lácteos concentrados, incluida la leche de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 veces concentrada. Se ha descubierto que pocos cultivos son capaces de crecer en sustratos de leche tan altamente concentrados. Por ejemplo, los cultivos de la presente invención son eficaces para crecer hasta al menos aproximadamente  $10^9$  CFU/gramos en aproximadamente 10 gramos y producir más de aproximadamente 2000 IU de nisina A/gramo en aproximadamente 18 horas, incluso en el medio de fermentación concentrado de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 veces. La cepa 329 se caracterizó utilizando la tipificación multilocus de secuencias (MLST), tipificación de fagos y ribotipificación como se describe más abajo.

Tipificación multilocus de secuencias (MLST)

El genoma públicamente disponible de *L. lactis* subsp. *lactis* IL 1403 (taxid:272623), también una cepa productora de nisina, se utilizó como plantilla para la selección de siete genes de mantenimiento para su uso como huellas genéticas en una comparación de IL 1403 con la cepa 329. Los genes seleccionados cubren un intervalo de loci en el cromosoma como se detalla a continuación en la Tabla 1. Se ampliaron y secuenciaron cada uno de los

siete genes. A continuación se alinearon y compararon las secuencias utilizando IL1403 como referencia. Cada variación de secuencia se contó y representa un alelo individual.

Tabla 1

5

Gen	Proteína	Ubicación del cromosoma
acmD (Id. de sec. n.º 2)	n-acetilmuramidasa	527.413—528.498
gapB (Id. de sec. n.º 3)	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	2.332.466—2.333.476
pdhD (Id. de sec. n.º 4)	Componente de lipoil deshidrogenasa de piruvato deshidrogenasa	58.971—60.389
pepC (Id. de sec. n.º 5)	Aminopeptidasa C	1.947.325—1.948.635
thiE (Id. de sec. n.º 6)	Tiamina fosfato pirofosforilasa	1.293.610—1.294.257
yjjD (Id. de sec. n.º 7)	Proteína permeasa del sistema transportador ABC	993.341—994.963
yyaL (Id. de sec. n.º 8)	Proteína de unión a GTP	11.119—12.234

#### Fagotipificación

10 Se utilizaron placas de ensayos para obtener un perfil de fagos de mezclas madre de fagos de alto título. Los fagos se identifican y los resultados de la fagotipificación se presentan en la Fig. 11.

#### Ribotipificación

15 Como se utiliza en la presente memoria, “ribotipificación” se refiere a la huella dactilar de fragmentos de restricción de ADN genómico que contienen la totalidad o parte de los genes que codifican para el ARNr 16S y 23S. Se realizaron técnicas de ribotipificación convencionales utilizando EcoRI como enzima de restricción. Los resultados se muestran en la Fig. 12. La ribotipificación confirmó que la cepa 329 de *Lactococcus lactis* es sustancialmente diferente de la cepa de *Lactococcus lactis* ATCC 11454 públicamente disponible, también una cepa productora de nisina.

#### 20 Análisis de secuencia de ADN

25 Se descubrió que la cepa 329 de *Lactococcus lactis* tiene una combinación única de genes de agrupaciones de exopolisacárido y nisina como se muestra en la Fig. 13. La cepa 329 de *Lactococcus lactis* incluye la secuencia de genes de clúster de nisina de la Tabla 2 mostrada a continuación y produce nisina A que tiene la secuencia de aminoácidos de la Fig. 14 (Id. de sec. n.º 1).

Tabla 2

GEN	Id. de sec. Número
Precursor de nisina A	Id. de sec. n.º 9
Proteína transportadora de nisina (nisG)	Id. de sec. n.º 10
Proteína transportadora de nisina (nisE)	Id. de sec. n.º 11
Proteína transportadora de nisina (nisF)	Id. de sec. n.º 12
Sistema de dos componentes de nisina, regulador de respuesta (nisR)	Id. de sec. n.º 13
Histidina quinasa receptora de sensor de nisina (nisK)	Id. de sec. n.º 14
Proteasa serina de procesamiento de péptido líder de nisina (nisP)	Id. de sec. n.º 15
Proteína de inmunidad de nisina	Id. de sec. n.º 16
Proteínas de biosíntesis de nisina (nisC)	Id. de sec. n.º 17
Proteína de unión a ATP de transporte de nisina (nisT)	Id. de sec. n.º 18
Proteína de biosíntesis de nisina (nisB)	Id. de sec. n.º 19

30 Se ha descubierto que, al menos en las condiciones de fermentación descritas en la presente memoria con referencia al método de la Fig. 1, la cepa 329 de *Lactococcus lactis* produce un nivel alto de nisina A 34-mérica en comparación con el péptido precursor de nisina A 57-mérica (el precursor de nisina A tiene la secuencia de aminoácidos de Id. de sec. n.º 20). La nisina A se produce por modificación posttraduccional del precursor de nisina A. Al menos en algunos enfoques, la cepa 329 de *Lactococcus lactis* produce nisina A en relación con el precursor de nisina A, en una relación de al menos aproximadamente 9:1, en otro aspecto de al menos aproximadamente 9,5:0,5. En cambio, Nisaplin® de Danisco incluye aproximadamente 83 por ciento de nisina A y 17 por ciento de precursor de nisina A.

5 Bajo las mismas condiciones de fermentación eficaces para producir nisina A descritas anteriormente, la cepa 329 de *Lactococcus lactis* también produce exopolisacárido, tal como, por ejemplo, en las condiciones de fermentación descritas en la presente descripción con referencia al método de la Fig. 1. La cepa 329 de *Lactococcus lactis* incluye los genes de clúster de EPS de la Tabla 3 siguiente:

Tabla 3

GEN	Número de Id. de sec.
Regulador transcripcional, familia XRE	Id. de sec. n.º 21
Esterasa (EpsX)	Id. de sec. n.º 22
Modulador transmembrana de tirosina-proteína quinasa (EPSC)	Id. de sec. n.º 23
Quinasa de proteína tirosina	Id. de sec. n.º 24
Undecaprenil fosfato galactosa fosfotransferasa	Id. de sec. n.º 25
Fosfatasa de proteína-tirosina dependiente de manganeso	Id. de sec. n.º 26
Proteína de biosíntesis de polisacárido (cpsF) / glicosil transferasa (cpsG)	Id. de sec. n.º 27
Glicosil transferasa (cpsg) / proteína de biosíntesis de polisacárido (cpsM(v))	Id. de sec. n.º 28
Proteína de familia 2 de glicosiltransferasa	Id. de sec. n.º 29
Azúcar transferasa, (epsL)	Id. de sec. n.º 30
Proteína de función desconocida, familia desconocida	Id. de sec. n.º 31
Proteína de función desconocida, familia desconocida / beta-1,3-glucosiltransferasa	Id. de sec. n.º 32
Proteína de biosíntesis de polisacárido (cpsM(v))	Id. de sec. n.º 33

10 Al menos en algunos enfoques, una cepa bacteriana productora de agente antimicrobiano útil en los métodos descritos en la presente memoria es capaz de producir tanto nisina A de aproximadamente 2.000 IU/gramo o más como exopolisacárido en las condiciones de fermentación descritas con referencia a la Fig. 1.

15 La información de secuencia proporcionada en la presente memoria no debe interpretarse de modo tan restrictivo como para requerir la inclusión de nucleótidos erróneamente identificados. Las secuencias descritas en la presente memoria pueden ser utilizadas por el experto en la técnica para aislar el gen completo de la cepa bacteriana y someter el gen a un análisis de secuencia adicional para identificar cualquier error de secuenciación.

20 Como se utiliza en la presente memoria, los términos “homología” e “identidad” se usan indistintamente. Con el propósito de determinar el porcentaje de identidad u homología de dos secuencias, las secuencias pueden alinearse para fines de comparación óptimos. A continuación, los nucleótidos o aminoácidos se comparan en las posiciones de nucleótido o aminoácido correspondientes de las dos secuencias. Por ejemplo, un nucleótido o aminoácido en una primera secuencia se considera idéntico a la de la segunda secuencia cuando el mismo nucleótido o aminoácido está ubicado en la posición correspondiente en la segunda secuencia. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas dividido por el número total de posiciones (es decir, posiciones de superposición) multiplicado por 100.

25 También se contemplan en la presente memoria los equivalentes funcionales de ácido nucleico. Por ejemplo, los equivalentes funcionales de ácido nucleico incluyen mutaciones silenciosas u otras mutaciones que no alteran la función biológica del polipéptido codificado.

30 En una forma, una cepa bacteriana productora de agente antimicrobiano útil en los métodos descritos en la presente memoria tiene uno o más genes de homología significativa con las Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33 y es capaz de producir nisina A y EPS en las mismas condiciones de fermentación. Como se define en la presente memoria, el término “homología significativa” significa al menos 70 por ciento, en otro aspecto al menos 75 por ciento, en otro aspecto al menos 80 por ciento, en otro aspecto al menos 85 por ciento de identidad, en otro aspecto al menos 90 por ciento de identidad, en otro aspecto al menos 95 por ciento de identidad, aún en otro aspecto al menos 99 por ciento de identidad, y aún en otro aspecto identidad completa.

40 En algunas propuestas, una cepa bacteriana productora de agente antimicrobiano útil en los métodos descritos en la presente memoria tiene al menos dos genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que

consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33, en otro aspecto tiene al menos tres genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33, en otro aspecto tiene al menos cuatro genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33, en otro aspecto tiene al menos cinco genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21 - 33, en otro aspecto tiene al menos seis genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33, en otro aspecto tiene al menos siete genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33, en otro aspecto tiene al menos ocho genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33, en otro aspecto tiene al menos nueve genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33, en otro aspecto tiene al menos diez genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33, en otro aspecto tiene al menos once genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33, en otro aspecto tiene al menos doce genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33, en otro aspecto tiene al menos trece genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33, en otro aspecto tiene al menos catorce genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33, en otro aspecto tiene al menos quince genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33, en otro aspecto tiene al menos dieciséis genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33, en otro aspecto tiene al menos diecisiete genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33, en otro aspecto tiene al menos dieciocho genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33, en otro aspecto tiene al menos diecinueve genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33, en otro aspecto tiene al menos veinte genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33, en otro aspecto tiene al menos veintiuno de los genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33, en otro aspecto tiene al menos veintidós genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33, en otro aspecto tiene al menos veintitrés genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33, y en otro aspecto tiene al menos veinticuatro genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en Id. de sec. n.º 9-19 y 21-33.

Volviendo a más de los detalles relacionados con los métodos de producción de un concentrado lácteo cultivado y un queso procesado eficaces y haciendo referencia primero a la Fig. 1, se proporciona un diagrama 10 de flujo de proceso que ilustra un método de producción de un material lácteo cultivado o concentrado 12 lácteo cultivado eficaz para producir tanto agentes antimicrobianos (tales como nisina A) como EPS a partir del mismo cultivo y en las mismas condiciones; cuyo producto es eficaz para usar con queso procesado. En este proceso ilustrativo 10, se puede utilizar una materia 14 prima láctea líquida, tal como un líquido lácteo como leche entera. En otros enfoques, el líquido lácteo inicial puede ser concentrado de proteína láctea y/o materiales de lactosuero. La materia prima 14 puede tener de aproximadamente 5 a aproximadamente 35 % de sólidos totales, de aproximadamente 0 a aproximadamente 16 por ciento de grasa, de aproximadamente 1 a aproximadamente 14 por ciento de proteína, y de aproximadamente 64 a aproximadamente 95 por ciento de humedad. En otra forma, la materia prima 14 es una leche entera concentrada 3,5 veces que tiene de aproximadamente 26 a aproximadamente 30 por ciento de sólidos totales, de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 por ciento de grasa, de aproximadamente 8 a aproximadamente 12 por ciento de proteína, y de aproximadamente 70 a aproximadamente 70 por ciento de humedad.

En otro enfoque, la materia prima 14 es un líquido lácteo concentrado obtenido a partir de la ultrafiltración de leche láctea líquida. La materia prima concentrada puede concentrarse a una concentración de 2 a 5 veces, determinado por los sólidos totales; en otros enfoques, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 4 veces, y en otros enfoques, de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 3,5 veces de líquido lácteo. Es decir, una concentración triple (3 veces) tiene 3 veces el nivel de sólidos totales con respecto a un líquido lácteo inicial y una concentración quintuple (5 veces) tiene aproximadamente 5 veces el nivel de sólidos totales con respecto al líquido lácteo inicial. En un enfoque, se puede usar una membrana de ultrafiltración para lograr una materia prima concentrada apropiada. Una membrana adecuada tiene un corte de peso molecular de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 KD. También pueden utilizarse otros métodos de concentración, incluida microfiltración, nanofiltración y ósmosis inversa según sea necesario para una aplicación particular.

Como se discute con más detalle a continuación, la fermentación en leches concentradas, tales como la leche de 2 veces a 5 veces concentrada de la presente memoria, presenta de forma típica problemas con los cultivos y fermentaciones antimicrobianas anteriores. La cepa 329 utilizada dentro de los productos y métodos de la presente descripción permite únicamente la fermentación en un líquido lácteo concentrado y, al mismo tiempo, permite la formación tanto de nisina como de EPS a partir de la misma cepa y en las mismas condiciones de fermentación. Utilizando las leches concentradas para la fermentación y la producción final de los ingredientes de queso procesado de la presente invención, se controla mejor el contenido de agua en el queso procesado resultante. Los componentes lácteos concentrados de la presente descripción combinan múltiples funcionalidades y componentes (es decir, tales como la nisina y el EPS) en el mismo ingrediente. En algunos enfoques, esto reduce la carga total de humedad en el proceso de fabricación de queso procesado y, en algunos casos, simplifica, además, la línea de ingredientes de queso procesado.

La materia prima 14, que es un componente lácteo líquido o líquido concentrado, se pasteuriza entonces 16 y entra a continuación en uno o más fermentadores 18. La pasteurización puede ser de aproximadamente 65,6 a aproximadamente 87,8 °C (de aproximadamente 150 a aproximadamente 190 °F) durante un tiempo de aproximadamente 20 a 40 segundos dando lugar a una temperatura de salida de la materia prima pasteurizada de aproximadamente 26,7 a aproximadamente 32,2 °C (de aproximadamente 80 a aproximadamente 90 °F). Un cultivo 20 productor de agente antimicrobiano, tal como cepas 329 de *Lactococcus lactis*, se añade al fermentador 18 junto con una solución base 22 tal como hidróxido de sodio (p. ej., un hidróxido de sodio diluido 5,5 N). En una forma, se añaden al fermentador de aproximadamente  $2 \times 10^6$  a aproximadamente  $2 \times 10^8$  CFU/ml del cultivo 20 productor de agente antimicrobiano. En una realización, el cultivo 20 es una forma descongelada del cultivo. En un enfoque, la temperatura de fermentación se mantiene a un valor de aproximadamente 25 a aproximadamente 35 °C (en algunos enfoques de aproximadamente 28 a aproximadamente 32 °C y, en otros enfoques, de aproximadamente 30 °C) y un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 (en otros enfoques, de aproximadamente 5,4 a aproximadamente 5,8 y, en otros enfoques, de aproximadamente 5,4 a aproximadamente 5,6) en el fermentador. También se pueden usar otras temperaturas y valores de pH si el cultivo es capaz de producir nisina y EPS a niveles deseados en las condiciones seleccionadas. Por ejemplo, en un enfoque, el pH está comprendido de aproximadamente 5 a aproximadamente 7 y la temperatura está comprendida de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 °C. La composición se puede fermentar en una variedad de diferentes períodos de tiempo para transmitir diferentes características de sabor a la composición. Por ejemplo, en un enfoque, la composición se fermenta de aproximadamente 18 a aproximadamente 22 horas. En otra forma, la fermentación puede tener lugar en un intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 48 horas. Como se muestra en la Fig. 5, variando el tiempo de fermentación, puede modificarse el sabor del componente diario cultivado y, en consecuencia, el sabor del queso procesado.

La composición se envía a continuación a un dispositivo 24 de cizalladura opcional para someter a cizalladura cuajos pequeños/blandos que pueden haberse formado. En una realización, el dispositivo de cizalladura puede ser un mezclador de rotor/estátor (tal como un dispositivo Dispax) u otro dispositivo de cizalladura de rotor. Este paso puede ser opcional en función de las otras condiciones de procesamiento, así como las propiedades de los materiales utilizados en el proceso. La composición se somete a continuación finalmente a una etapa 26 de tratamiento térmico opcional. En una forma, la composición se somete a tratamiento térmico 26 a una temperatura de aproximadamente 65,6 °C a aproximadamente 71,1 °C (de aproximadamente 150 °F a aproximadamente 160 °F) durante de aproximadamente 60 a aproximadamente 100 segundos. En otra forma, la composición se somete a tratamiento térmico para reducir el valor de CFU/ml a menos de aproximadamente 1.000 CFU/ml. La composición resultante 12 es un componente lácteo cultivado o un concentrado lácteo cultivado que incluye nisina y/o material productor de nisina y, al mismo tiempo, EPS y/o un material productor de EPS. Al menos en algunos enfoques, estos dos componentes se producen ventajosamente a partir de la misma cepa bacteriana de partida, tal como la cepa 329, y bajo las mismas condiciones de fermentación. La composición puede estar en forma de un líquido que tiene de aproximadamente 6 a aproximadamente 40 % de sólidos totales. En una forma, el líquido tiene de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 % de sólidos totales y, en algunos enfoques, aproximadamente 28,5 % de sólidos totales.

En un método alternativo 200 mostrado en la Fig. 1A, los polvos hidratados y/o la leche líquida 202 pueden ser primero calentados 204, tal como en una etapa de proceso de esterilización a alta temperatura, de corto tiempo (HTST) o a una temperatura ultra alta (UHT). A continuación, se fermenta 206 el líquido calentado con materiales, cultivos y condiciones similares, como se describe con respecto al método discutido anteriormente. Después de la fermentación, el material se puede someter de forma opcional a cizalladura 208 y a continuación concentrar 210. En este enfoque, la concentración puede ser filtración por membrana, evaporación o centrifugación. Después de la concentración, el concentrado resultante puede calentarse opcionalmente 212 nuevamente con el uso de HTST o UHT, por ejemplo.

En la Fig. 2 se ilustra otro proceso 100 para preparar componentes lácteos cultivados. El proceso 100 de la Fig. 2 utiliza materias primas 112 en polvo tales como concentrado de proteína de leche en polvo y lactosuero en polvo. En este enfoque, se mezclan de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 por ciento de concentrado de proteína de leche en polvo, de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 por ciento de lactosuero en polvo y de aproximadamente 75 a aproximadamente 95 por ciento de agua en un tanque o un fermentador 118 para formar el medio de fermentación. Los polvos pueden mezclarse 114 e hidratarse antes de añadirlos al fermentador 118. Estos materiales de partida se combinan a continuación con un cultivo productor de agente antimicrobiano 120, tal como la cepa 329 de *Lactococcus lactis*, en una cantidad de aproximadamente  $2 \times 10^6$  CFU/mL a aproximadamente  $2 \times 10^9$  CFU/mL en el recipiente de fermentación 118 y se fermentan de un modo similar al descrito para la Fig. 1. De forma similar al método de la Fig. 1, también se puede añadir al recipiente de fermentación 118 agua de proceso y una base, tal como hidróxido de sodio diluido, desde el tanque 123. Después de la fermentación, la composición puede calentarse o enfriarse, opcionalmente, según sea necesario y, a continuación, prepararse como un componente 112 lácteo cultivado final. En algunos enfoques, el proceso puede incluir un calentamiento y enfriamiento 132 intermedio variado según sea necesario para una aplicación particular. A este respecto, la composición 112 puede colocarse en uno o más tanques de retención 130 u otra ubicación de almacenamiento para usar en forma líquida concentrada. Las temperaturas de mantenimiento del tanque pueden ser de aproximadamente -1,1 a aproximadamente 10 °C (de aproximadamente 30 a aproximadamente 50 °F). En una realización (tal como en una forma líquida), el componente lácteo cultivado tiene de aproximadamente 6 a aproximadamente 11 % de sólidos totales y, en otra forma, aproximadamente 20 % de sólidos totales. Además, el componente lácteo cultivado se puede secar por pulverización, tal como en un atomizador 140. En un enfoque, el atomizador puede tener una temperatura de secador de

aproximadamente 71,1 a aproximadamente 82,2 °C (de aproximadamente 160 a aproximadamente 180 °F) y una caída de presión de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,17 MPa (de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 psi).

El componente lácteo cultivado utilizado en el método de la presente memoria puede adoptar diversas formas. Por ejemplo, como se muestra en las Figs. 1 y 2, el componente lácteo cultivado puede estar en forma de líquido. El componente lácteo cultivado también puede adoptar la forma de un polvo, tal como un producto de deshidratación por pulverización como se muestra en la Fig. 2. Además, el componente lácteo cultivado también puede estar en forma concentrada, tal como componentes obtenidos por evaporación, filtración y similares. El producto resultante del método de las Figs. 1 o 2 puede ser un líquido o un producto secado por pulverización dependiendo de la aplicación particular. La Fig. 2 proporciona etapas ilustrativas para la deshidratación por pulverización y se apreciará que estas etapas también se pueden utilizar con los métodos de la Fig. 1. Se apreciará que si el componente lácteo cultivado se procesa adicionalmente por concentración, deshidratación por pulverización o de modo similar, este procesamiento adicional se completará de modo que no afecte de forma sustancial a la nisina ni/o al EPS.

El componente lácteo cultivado producido mediante los métodos de las Figs. 1 y 2 tanto con agentes antimicrobianos como con EPS producido a partir de la misma cepa bacteriana se puede usar a continuación en y/o para fabricar queso procesado. En una realización, el queso procesado puede prepararse mezclando queso natural o mezcla de quesos naturales, humedad, y una fuente de proteína láctea adicional opcional (tal como concentrado de proteína de leche, lactosuero, concentrado de proteína de lactosuero, leche ultrafiltrada, y similares) y el componente lácteo cultivado. El cloruro de sodio puede añadirse para añadir sabor. Pueden añadirse otros ingredientes opcionales para mejorar la textura, el sabor, la nutrición y/o propiedades de coste. Estos incluyen, aunque no de forma limitativa, ingredientes derivados de lactosuero (p. ej., concentrado de proteína de lactosuero), leche deshidratada desnatada, concentrado de proteína de leche, grasa de leche anhidra, gomas, almidones, gelatina y similares. Los ingredientes se mezclan entre sí y a continuación se calientan a temperaturas de pasteurización. Opcionalmente, se puede aplicar cizalladura durante o después del calentamiento.

Proteína de lactosuero se refiere a una colección de proteínas globulares que se pueden aislar del lactosuero, que es el líquido que queda después de haberse cuajado y filtrado la leche. La proteína de lactosuero es de forma típica una mezcla de beta-lactoglobulina, alfa-lactoalbúmina, y proteínas de albúmina sérica. En una realización, se puede utilizar concentrado de proteína de lactosuero (WPC) como fuente de proteína de lactosuero. El WPC se obtiene de lactosuero por medio de técnicas de concentración convencionales. La fuente de proteína de lactosuero también puede incluir lactosa, vitaminas, minerales y grasa.

La humedad se puede añadir a la mezcla mediante cualquier método, tal como, aunque no de forma limitativa, inyectando vapor en la caldera (p. ej., una caldera de depósito), añadiendo a la mezcla vapor condensado de la cocción y/o por adición directa de agua. La humedad también puede entrar en el sistema por supuesto a través de diversos ingredientes (p. ej., humedad del queso natural). La humedad total de los productos de queso final incluye toda la humedad independientemente de la forma en que la humedad se haya introducido en el producto final. De forma ventajosa, debido a que los componentes lácteos cultivados utilizados en el método de la presente descripción, en algunas formas, son componentes lácteos concentrados que incluyen tanto nisina como EPS al mismo tiempo, se mejora el manejo del agua del queso procesado. A este fin, debido a que no es necesario añadir por separado la nisina y otros ingredientes modificadores de la textura, se tiende a añadir menos agua al queso procesado mediante el ingrediente del componente lácteo cultivado.

Como es conocido por el experto en la técnica, los ingredientes pueden usarse en cantidades variables en el queso procesado producido mediante el método de la presente invención en función del resultado deseado del producto de queso. Por ejemplo, para un producto de queso sódico reducido, un maestro quesero puede incluir una cantidad de sal pequeña o no introducir sal en la mezcla de queso. El queso procesado producido mediante el método de la presente invención puede también incluir un intervalo de cantidades de los componentes lácteos cultivados, dependiendo de la forma y composición de los componentes lácteos cultivados y la forma deseada del queso procesado.

Por ejemplo, y en una forma, el queso procesado producido mediante el método de la presente invención puede incluir de aproximadamente 10 % a aproximadamente 90 % de queso natural. Según otra forma, el queso procesado producido mediante el método de la presente invención puede incluir de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 % de queso natural. En otra forma más, los quesos procesados producidos mediante el método de la presente invención pueden incluir de aproximadamente 35 a aproximadamente 55 % de queso natural. Como se utiliza en la presente memoria, queso natural significa, generalmente, queso proporcionado a partir de queso no pasteurizado obtenido de leche cuajada y uno de los siguientes: cuajo, sustitutos de cuajo, acidificación y combinaciones de los mismos.

El queso procesado producido mediante el método de la presente invención puede incluir también un número de otros ingredientes lácteos procedentes de diversas fuentes según sea necesario para una aplicación particular. Por ejemplo, y en una forma, el queso procesado producido mediante el método de la presente memoria puede incluir concentrado de proteína de leche de aproximadamente 0 a aproximadamente 50 % (en otros enfoques, de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 %), concentrado de proteína de lactosuero de aproximadamente 0 a aproximadamente 25 % (en otros enfoques, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 %), lactosuero de aproximadamente 0 a aproximadamente 30 % (en otros enfoques, de aproximadamente 1 a aproximadamente

10 %), grasa de leche/nata de aproximadamente 0 a aproximadamente 30 % (en otros enfoques, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 %) y similares. El queso procesado producido mediante el método de la presente invención también incluye emulsionantes, tales como citrato sódico, fosfato disódico y similares en una cantidad de aproximadamente 0 % a aproximadamente 5 % (en otros enfoques, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 %). El queso procesado producido mediante el método de la presente invención también puede incluir sal, saborizantes, enriquecimientos, colorantes y similares para proporcionar el color, el sabor, etc. deseados. El queso procesado producido mediante el método de la presente invención también puede incluir agua y/o humedad añadidos de los ingredientes para proporcionar la humedad del producto acabado deseada. Por ejemplo, también pueden añadirse vitaminas y otros minerales según sea necesario para enriquecer el queso procesado, según un enfoque, de aproximadamente 0 a aproximadamente 3 por ciento de vitamina A, vitamina D y/o polvos de calcio (tales como fosfato tricálcico). En otras aplicaciones, también puede añadirse sal según sea necesario. En algunos enfoques, se pueden añadir de aproximadamente 0 a aproximadamente 5 por ciento de sal.

Además, en lugar de conservantes tradicionales, el queso procesado producido mediante el método de la presente invención incluye el componente lácteo cultivado de la presente descripción y fabricado mediante los métodos descritos en la presente memoria. En una forma, el queso procesado producido mediante el método de la presente invención puede incluir de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 % de componente lácteo cultivado. En otra forma, el queso procesado producido mediante el método de la presente invención incluye de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 % de componente lácteo cultivado. En algunos enfoques, los componentes lácteos cultivados de la presente descripción proporcionan una actividad antimicrobiana total mucho más elevada como equivalente de nisina con respecto al contenido de nisina (relación de actividad de nisina). Por ejemplo, y en algunos enfoques, los componentes lácteos cultivados y el queso procesado utilizando las cantidades de componentes lácteos cultivados descritos en la presente memoria presentan una relación de actividad de nisina de aproximadamente 0,3 o inferior.

Debe mencionarse que los componentes lácteos cultivados utilizados en el método de la presente invención pueden utilizarse en sustitución de conservantes artificiales y/o pueden usarse, además, para complementar o reemplazar parcialmente otros componentes de la composición de queso procesado total. Por ejemplo, dependiendo de la forma del componente lácteo cultivado, la cantidad del componente lácteo cultivado se puede utilizar para complementar o sustituir de otro modo una parte de los demás materiales lácteos de la composición, tales como la grasa de la leche, la caseína, el lactosuero y similares. En otras palabras, la relación de los otros materiales lácteos se puede modificar como resultado del uso de los componentes lácteos cultivados. Cuando los quesos procesados producidos por el método de la presente invención incluyen los componentes lácteos cultivados de la presente invención, el queso puede estar sustancialmente exento de conservantes tradicionales, tales como ácido sórbico, nitritos y similares. Según un enfoque, sustancialmente exento de generalmente significa menos de aproximadamente 0,5 por ciento, en otros enfoques, menos de aproximadamente 0,1 por ciento y, en otros enfoques, no presente(s) en absoluto.

En una forma, el queso procesado producido mediante el método de la presente invención incluye aproximadamente 40 % de queso natural, 35 % de otros materiales lácteos, aproximadamente 8 % de componentes lácteos cultivados, aproximadamente 12 % de agua y las sales, saborizante, colorantes, vitaminas, minerales y similares restantes. El queso procesado producido mediante el método de la presente invención puede fabricarse como se entiende generalmente con la adición de los componentes lácteos cultivados durante la cocción y, de forma alternativa, durante las etapas de mezclado del queso. En una forma, el producto de queso producido mediante el método descrito en la presente memoria puede ser cualquier salsa de queso, queso para untar, bloque de queso, una loncha de queso, queso rallado, o similares. En algunos enfoques, las diversas formas de queso procesado producido mediante el método de la presente descripción pueden incluir de aproximadamente 10 a aproximadamente 90 % de queso natural, de aproximadamente 0 a aproximadamente 50 % de concentrado de proteína de leche, de aproximadamente 0 a aproximadamente 30 % de grasa de leche o nata, de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 % de agua, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 % de componente lácteo cultivado, de aproximadamente 0 a aproximadamente 30 % de lactosuero, y de aproximadamente 0 a aproximadamente 25 % de concentrado de proteína de lactosuero en combinación con diversos sabores, sales y emulsionantes opcionales arriba descritos.

En otra forma, el queso procesado incluye de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 % de grasa total (en otros enfoques, de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 % de grasa), de aproximadamente 8 a aproximadamente 25 % de proteína total (en otros enfoques, de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 % de humedad total), y de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 % de humedad total (en otros enfoques, de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 % de humedad).

El queso procesado elaborado con los componentes lácteos deshidratados utilizados en el método de la presente descripción no solo presenta ventajas inesperadas de textura porque logra un perfil de fusión mejorado y mayor firmeza sino que, al mismo tiempo, el queso procesado elaborado con los componentes lácteos cultivados utilizados en el método de la presente descripción presenta, además, características antimicrobianas mejoradas en el contexto de un producto de alto contenido en grasa y en proteína, tal como un queso procesado con una cantidad de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 % de grasa y de aproximadamente 8 a aproximadamente 25 % de proteína. Aunque se entendía que formas comerciales de nisina anteriores inhibían *C. botulinum* en un medio líquido o caldo, cuando dichas formas anteriores de nisina se utilizaron en sistemas alimentarios de alto contenido en proteína y alto contenido en grasa, tales como queso procesado, la nisina era

menos eficaz en términos de inhibición del *C. botulinum* y otros patógenos. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que el alto nivel de proteína, alto nivel de grasa y, en algunos casos, el bajo nivel de humedad de los quesos procesados descritos en la presente memoria, tienden a proteger y/o encapsular *C. botulinum* y otros patógenos que hacen que la nisina tradicional y los agentes antimicrobianos naturales tradicionales sean menos eficaces. Se ha descubierto de forma inesperada que la nisina obtenida de cultivos antimicrobianos de la presente memoria y, en particular, la cepa 329, son eficaces para inhibir *C. botulinum* y otros patógenos transmitidos por los alimentos, como la *Listeria monocytogenes*, en el contexto del queso procesado de alto contenido en grasa y alto contenido en proteína mucho mejor que otras formas de nisina como se muestra de forma general a continuación en el ejemplo 1. En algunos enfoques, el componente lácteo cultivado en el queso procesado obtenido mediante el método de la presente invención proporciona una cantidad de nisina eficaz para evitar la formación de la toxina de al menos *C. botulinum* según lo determinado por el bioensayo de toxinas convencional con ratones en el queso procesado a los niveles de proteína altos y de grasa altos descritos en la presente memoria durante al menos un período de aproximadamente 9 a aproximadamente 10 días a aproximadamente 30 °C (a aproximadamente 86 °F). En un enfoque, el ensayo de biotoxinas puede realizarse de acuerdo con Haim M. Solomon y col., Bacteriological Analytical Manual, capítulo 17, *Clostridium botulinum*, enero de 2001, disponible en <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070879.htm>, que se ha incorporado como referencia en la presente memoria.

Los componentes lácteos cultivados producidos mediante el método de la presente descripción no solo inhiben *C. botulinum* y otros patógenos en el contexto de un queso procesado con alto nivel en proteína y queso, los componentes lácteos cultivados logran tales efectos inhibitorios a niveles de actividad menores y/o niveles de dosificación menores que los posibles anteriormente.

En otros enfoques, las formas líquidas de los componentes lácteos cultivados que se utilizan en el método de la presente invención o se elaboran mediante los procesos de la presente invención retienen niveles más altos de actividad de nisina en el queso procesado final, que no se alcanzaron utilizando las formas comerciales anteriores de nisina cuando se usan en quesos procesados. Según un enfoque, los ingredientes lácteos cultivados utilizados en el método descrito en la presente memoria y fabricados mediante los métodos descritos en la presente memoria son eficaces para retener de aproximadamente 50 a aproximadamente 90 por ciento de actividad y, en otros enfoques, de aproximadamente 60 a aproximadamente 75 por ciento de actividad en comparación con la actividad del ingrediente antes de la incorporación en el queso procesado.

En algunos enfoques, el componente lácteo cultivado se prepara utilizando un líquido lácteo ultrafiltrado antes o después de la fermentación. En estas propuestas, el componente lácteo cultivado tiene niveles reducidos de lactosa y otros minerales lácteos. Por ejemplo, y en algunos enfoques, el componente lácteo cultivado y el queso procesado que utilizan el componente lácteo cultivado pueden tener menos de aproximadamente 0,1 por ciento de lactosa y menos de aproximadamente 15 por ciento de lactato de sodio como ácido. En otros enfoques, el componente lácteo cultivado y el queso procesado que utilizan el componente lácteo cultivado también pueden tener menos de aproximadamente 600 mg/100 mg de calcio.

Las ventajas y realizaciones de los métodos, y composiciones obtenidas mediante los métodos descritos en la presente memoria se ilustran de forma más detallada en los siguientes ejemplos; no obstante, las condiciones, diagramas de procesamiento, materiales y cantidades específicos que se mencionan en estos ejemplos, así como otras condiciones y detalles, no se considerarán innecesariamente limitativos de este método. Todos los porcentajes y relaciones dentro de esta descripción son en peso salvo que se indique lo contrario.

#### Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la capacidad de lonchas de queso procesado preparadas con componentes lácteos cultivados como se ha descrito anteriormente y muestras de control de queso procesado sin el componente lácteo cultivado, utilizando, en su lugar, ácido sórbico como conservante. Las muestras se prepararon generalmente como lonchas de queso procesado con aproximadamente 46 por ciento de humedad, aproximadamente 23 por ciento de grasa, aproximadamente 1,2 por ciento de sal, y aproximadamente 18 por ciento de proteína, con cantidades variables de conservantes y/o componentes lácteos cultivados (cuando se indican), saborizantes, colorantes, vitaminas, minerales y similares.

#### Ejemplo 1

Se prepararon lonchas de queso procesado utilizando un componente lácteo cultivado en líquido con 28 % de sólidos tal como se describe en la presente memoria a partir de la cepa 329 y se comparó con las lonchas de queso procesado preparadas con lactosuero deshidratado por pulverización cultivado. El lactosuero deshidratado por pulverización cultivado estaba en forma de polvo con aproximadamente 96 % de sólidos con prácticamente ninguna grasa y poca proteína. Tanto el lactosuero deshidratado por pulverización comercial, cultivado como el componente lácteo cultivado líquido preparados según el proceso de la Fig. 1 y utilizando la cepa 329 se utilizaron en un queso procesado. La Tabla 4 ilustra a continuación que el queso procesado preparado con componentes lácteos cultivados de la cepa 329 retuvo la actividad antimicrobiana significativamente en mayor medida en comparación con los materiales antimicrobianos

comercialmente disponibles. Este efecto de retención de actividad se observó para las cargas al 6 % y al 8 % de los componentes lácteos cultivados en el queso procesado. A este respecto, como los componentes lácteos cultivados retienen la actividad antimicrobiana mucho mejor que el agente microbiano disponible comercialmente, el efecto antimicrobiano puede durar más tiempo y requerir por lo demás una dosificación más baja para una misma eficacia.

5

Tabla 4: Retención de actividad de los agentes antimicrobianos en el queso procesado

Antimicrobiano	Actividad del ingrediente AU/g	% de uso en el queso procesado	Nivel de dosificación AU/g	Nivel de actividad en la loncha de queso procesado, AU/g	% de retención
Lactosuero cultivado deshidratado por pulverización, comparativo	20.000	1 %	200	90	45 %
Lactosuero cultivado deshidratado por pulverización, comparativo	20.000	2 %	400	130	32,5 %
Componente lácteo cultivado líquido de la presente descripción	2220	6 %	133,2	90	67,6 %
Componente lácteo cultivado líquido de la presente descripción	2220	8 %	177,6	150	84,5

Se preparó otra comparación, donde se preparó un componente lácteo cultivado líquido preparado a partir de polvos y se combinó con agua líquida según el método de la Fig. 2 con aproximadamente 20 % de sólidos totales. En esta comparación, se incluyó una fuente de nisina comercialmente disponible (Nisaplin, Danisco) y un polvo de lactosuero deshidratado por pulverización en queso procesado y se compararon con un queso procesado similar preparado con el componente lácteo cultivado de la presente descripción. Como se muestra a continuación en la Tabla 5, cuando se utilizó 8 % del componente lácteo cultivado elaborado a partir de la cepa 329 según la presente descripción en lonchas de queso procesado, no se detectó toxina (*C. Botulinum*) después de aproximadamente 10 días mientras que un queso procesado similar preparado con agentes antimicrobianos comerciales (Nisaplin o lactosuero cultivado deshidratado por pulverización) tenía toxinas presentes al cabo de aproximadamente 7 y 10 días. El estudio de exposición a la toxina fue realizado por el Silliker Laboratory. Si se desea, pueden usarse también otras metodologías convencionales para estudios de exposición a toxina.

20

Tabla 5: Estudio de exposición a *C. botulinum*

Antimicrobiano	% de uso en el queso procesado	AU medida del producto acabado	Resultados clave del estudio de exposición a CBOT
Nisina comercialmente disponible, comparativa (Nisaplin)	0,023 %	210 AU	Toxina presente a los 10 días
Lactosuero cultivado, deshidratado por pulverización, comparativo	1 %	90 AU	Toxina positiva a los 7 días a 30 °C (86 °F)
Componente lácteo cultivado de la presente descripción (20 % de sólidos totales, líquido)	8 %	70 AU	Sin toxina presente a los 10 días

## Ejemplo 2

25

Se realizaron comparaciones de sabor en muestras de lonchas de queso procesado como se muestra en la Fig. 3. Se prepararon muestras de queso procesado con aproximadamente 0,2 por ciento de ácido sórbico como conservante (identificado como "control") o sin ácido sórbico y aproximadamente 8 % de componente lácteo cultivado preparado según la presente descripción y utilizando la cepa 329 (identificada como "variable 8") y degustada y evaluada por un panel sensorial entrenado. Como se muestra en la Fig. 8 (que resume la percepción de sabor en la boca del panel entrenado), el queso procesado preparado con los componentes lácteos cultivados de la presente descripción generalmente tenía el mismo perfil de percepción de sabor que el queso procesado preparado con ácido sórbico como conservante. Por lo tanto, se espera que sería aceptable, desde un aspecto de la percepción de sabor, reemplazar ácido sórbico como conservante por componentes lácteos cultivados.

35

Ejemplo 3

Se prepararon numerosas muestras de queso procesado para comparar los perfiles de fusión de lonchas de queso procesado preparadas con y sin los componentes lácteos cultivados obtenidos a partir de la cepa 329 de la presente solicitud. Las muestras incluyen de aproximadamente 2 % a aproximadamente 8 % de componentes lácteos cultivados y se compararon con muestras de control sin los componentes lácteos cultivados. La grasa, humedad, proteína y pH del queso se mantuvieron relativamente constantes entre todas las muestras de ensayo (de aproximadamente 43 a aproximadamente 44 por ciento de humedad y un pH de aproximadamente 5,7). Las muestras de control sin el componente lácteo cultivado contenían 0,18 % de ácido sórbico como conservante o, en algunos casos, estaban exentas de ácido sórbico para descartar que la masa fundida se debía a la falta de ácido sórbico. En este ejemplo, el diámetro en estado fundido de las muestras preparadas con el componente lácteo cultivado aumentó. Las demás no. Esto lo demuestran los datos de las Tablas 6, 7 y 8 siguientes.

Cada muestra de ensayo incluía 3 lonchas circulares de queso procesado apiladas una encima de otra. Las muestras se colocaron en la parte superior de un “hervidor doble” (baño María) y se calentaron con agua hirviendo sobre calor medio durante aproximadamente 4 minutos. Como se muestra en las Figs. 4A-D y 5A-C, las muestras preparadas con componentes lácteos cultivados tenían un área de superficie aumentada cuando se fundieron en comparación con las muestras de control sin los componentes lácteos cultivados de la presente solicitud. Como se muestra en la Fig. 5C, el diámetro de fusión del queso de control era de aproximadamente 2,86 centímetros (aproximadamente 1,125 pulgadas), mientras que el diámetro de fusión de las muestras de la invención con aproximadamente 6 por ciento del componente lácteo cultivado era de aproximadamente 4,06 y aproximadamente 3,68 centímetros (de aproximadamente 1,6 y aproximadamente 1,45 pulgadas). En estas figuras, las muestras de control se etiquetan con “C” y las muestras de la invención se etiquetan con I2, I4, I6, o I8, que representan discos de queso procesado de la invención con aproximadamente 2 por ciento, 4 por ciento, 6 por ciento u 8 por ciento de componente lácteo cultivado elaborado con la cepa 329.

Se completaron mediciones del área superficial para medir los perfiles de fusión de las muestras. Las Tablas 6, 7 y 8 ilustran a continuación las áreas de superficie calculadas usando el programa ImageJ (un programa de procesamiento de imágenes basado en Java, National Institute of Health) para algunas de las muestras que corresponden a las mostradas en las Figs. 4A-D y 5A-C. Como se muestra en las tablas, las muestras de queso procesado preparadas con los componentes lácteos cultivados de la presente solicitud al 4 %, 6 % y 8 % en queso procesado mostraron todas un área de superficie aumentada al fundirse en comparación con los controles sin componentes lácteos cultivados. Generalmente, los consumidores prefieren queso procesado con una mayor capacidad de fusión, tal como muestran las muestras con componentes lácteos cultivados.

Tabla 6: Mediciones de superficie específica

Muestra	Superficie específica (píxeles cuadrados)	Superficie específica (píxeles cuadrados)
Lote de control	89088	189300
8 % de componente lácteo cultivado	139149	326995
% de aumento de área con componente lácteo cultivado	56,19 %	72,74 %

Tabla 7: Medición de la superficie específica

Muestra	Superficie específica (píxeles cuadrados)	% de aumento de área con componente lácteo cultivado
Lote de control	167488	n/a
4 % de componente lácteo cultivado líquido	211365	26,20 %
4 % de componente en polvo lácteo cultivado	223930	33,70 %

A partir de los datos anteriores, las muestras que incluyen el componente lácteo cultivado de la presente descripción dieron como resultado un disco más amplio que las muestras de control sin el componente lácteo cultivado.

Tabla 8: Medición de la superficie específica

Muestra	Superficie específica (píxeles cuadrados)	% de aumento de área con componente lácteo cultivado
Lote de control	179171	n/a
6 % de componente lácteo cultivado en líquidos	233075	30,09 %

6 % de polvo de componente lácteo cultivado	248472	36,68 %
---	--------	---------

Ejemplo 4

5 Las Figs. 6-9 ilustran comparaciones de firmeza y consistencia entre las lonchas de queso procesado obtenidas con componentes lácteos cultivados preparados mediante los métodos de la presente solicitud utilizando la cepa 329 y sin los componentes lácteos cultivados (control). En este ejemplo, los sólidos, proteína, grasa y humedad se mantuvieron relativamente constantes para todas las muestras probadas. Las muestras sin el componente lácteo cultivado incluían 0,18 de ácido sórbico como conservante y, en algunos casos, no contenían ácido sórbico o conservantes para descartar que la firmeza era debida a la ausencia de ácido sórbico. En este ejemplo, solo las  
10 muestras con el componente lácteo cultivado experimentaron un aumento de la firmeza y la consistencia.

Como se muestra en las Figs. 6 y 8, el queso procesado con componentes lácteos cultivados mostró una firmeza (es decir, módulo de Young) aumentada en comparación con las muestras de control obtenidas sin componentes lácteos cultivados. En general, esta mayor firmeza sugiere a los consumidores una composición de queso más natural. El módulo de Young, que también se conoce como módulo de tracción, es una medida de la rigidez de un material. En el contexto de un queso procesado, el módulo de Young es una medida del tacto inicial de la loncha de queso. En el contexto de este ejemplo, el tacto inicial significa la resistencia que proporciona el queso cuando se toca con el dedo o la mano. Es otra medida de la percepción de firmeza. El módulo de Young se midió utilizando un análisis de perfil de textura (MTPA) utilizando una máquina de análisis de textura (Texture Technologies Corp) que mide la cantidad de fuerza necesaria para penetrar una pila de lonchas de queso cuando se aplica un peso conocido. Para esta prueba, se apilan aproximadamente diez lonchas de queso de 21 gramos. En general, el módulo de Young se calcula dividiendo el esfuerzo de tensión por la deformación por tensión en el material y representa la relación de esfuerzo (carga) a la tensión (deformación) en la región inicial de Hooke. Esto representa de forma típica lo rígido o firme que una muestra es en respuesta a una carga externa. Además, un producto que tiene un valor de consistencia más alto debe proporcionar una percepción sensorial más masticable.  
15

Además, las Figs. 7 y 9 ilustran la consistencia de las muestras de queso procesado mediante la firmeza durante el flujo del queso mientras se está aplicando la fuerza durante la prueba MPTA. Como se muestra en las Figs. 7 y 9, el queso procesado con componentes lácteos cultivados mostró una mayor consistencia durante el flujo en comparación con las muestras sin componentes lácteos cultivados. En general, esta mayor firmeza durante el flujo también sugiere una composición de queso más natural para los consumidores. Como se utiliza en la presente memoria, la consistencia se relaciona generalmente con la firmeza durante el flujo o la resistencia al flujo. En el contexto del queso procesado, cuanto más alto sea el valor de la consistencia, menor será la velocidad de disgregación del queso en la boca, que generalmente se percibe como una característica deseable para los consumidores.  
20

Como se ha mostrado anteriormente, las composiciones de queso procesado preparadas con componentes lácteos cultivados de la presente descripción y fabricadas a partir de la cepa 329 son capaces de proporcionar propiedades antibacterianas y funcionalidad del conservante al menos equivalentes, si no mejoradas. Además, se ha descubierto inesperadamente que el queso procesado preparado con estos componentes lácteos cultivados presenta una fusión mejorada y, al mismo tiempo, una mayor firmeza del queso procesado. Generalmente, se esperaba anteriormente que al aumentar la fusión del queso, se redujera su firmeza. Se cree que los materiales generados en el componente lácteo cultivado mediante la cepa 329 también ayudan a mejorar de forma inesperada ambas propiedades del queso al mismo tiempo.  
25

Ejemplo 5

Se usó leche 3 veces concentrada (pH 5,46) como medio líquido para la fermentación de componentes lácteos cultivados. Se tomó una muestra de la leche 3 veces concentrada antes de la inoculación con la cepa 329 de *L. lactis*. Los componentes lácteos cultivados se prepararon de acuerdo con el proceso de la Fig. 1 con una fermentación de aproximadamente 21 horas. Se tomó otra muestra después de la fermentación (pH 5,46). A continuación, las muestras se tiñeron utilizando conjugado de Conavalina A Alexa Fluor® 488, que se une selectivamente a los residuos de  $\alpha$ -manopiranosil y  $\alpha$ -glucopiranosil, para determinar si los exopolisacáridos se produjeron durante la fermentación. La ConA de Alexa Fluor 488 se disolvió en tampón de fosfato 0,1 M a pH 6,8 y se diluyó con fracción permeada de lactosuero a pH 6. Se aplicaron gotas de solución colorante a las muestras sobre un portaobjetos de vidrio de cámaras y se dejaron durante 30 minutos a 25 °C. A continuación, los portaobjetos se cubrieron con un cubreobjetos de vidrio y se observaron con un microscopio láser de barrido confocal (CSLM) Leica SP5 con un objetivo de 20 aumentos con longitudes de onda de 495 nm (excitación) y 519 nm (emisión). Como se muestra en las Figs. 15A y 15B (barra de escala 25  $\mu$ m), se observó exopolisacárido (EPS) en la muestra fermentada pero no en la materia prima de leche 3 veces concentrada antes de la inoculación con la cepa 329. El EPS se observó como una gran masa agregada.  
30  
35  
40  
45  
50  
55

5

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Kraft Foods Group Brands LLC  
 <120> QUESO PROCESADO CON COMPONENTES LÁCTEOS CULTIVADOS  
 10 <130> 1410-131457  
 <160> 33  
 15 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 20 <213> Lactococcus lactis  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_VARIOS  
 25 <222> (2)..(2)  
 <223> Deshidrobutirina (beta-metildeshidroalanina)  
 <220>  
 <221> TIOET  
 30 <222> (3)..(7)  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_VARIOS  
 <222> (5)..(5)  
 35 <223> Deshidroalanina  
 <220>  
 <221> TIOET  
 <222> (8)..(11)  
 40 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_VARIOS  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Ácido aminobutírico  
 45 <220>  
 <221> TIOET  
 <222> (13)..(19)  
 50 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_VARIOS  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Ácido aminobutírico  
 55 <220>  
 <221> TIOET  
 <222> (23)..(26)  
 <220>  
 60 <221> CARACTERÍSTICA\_VARIOS  
 <222> (23)..(23)  
 <223> Ácido aminobutírico  
 <220>  
 65 <221> TIOET  
 <222> (25)..(28)  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_VARIOS  
 70 <222> (25)..(25)  
 <223> Ácido aminobutírico

ES 2 678 699 T3

5

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_VARIOS  
 <222> (33)..(33)  
 <223> Deshidroalanina

10

<400> 1

Ile Xaa Ala Ile Xaa Leu Ala Xaa Pro Gly Ala Lys Xaa Gly Ala Leu  
 1 5 10 15

15

Met Gly Ala Asn Met Lys Xaa Ala Xaa Ala His Ala Ser Ile His Val  
 20 25 30

20

Xaa Lys

25

<210> 2  
 <211> 1086  
 <212> ADN  
 <213> Lactococcus lactis

30

<400> 2  
 atgaaacaga aacataaatt agcgccttggg gcgcaattg ttgctttggc aagtcttggg 60

gggattaaag cacaagctgc atctgttcaa gaaattatta acgctgcggt accagtggca 120

35

aatgactacg gactttatcc atcagtaatg attgcccaag ggattttaga atcaagtggg 180

ggacaaagtg ccttagcaag caattataat aatatttttg gagttaaata cacttctggg 240

40

acacctgttt atctaccaac acaagagtat ttgaatggaa caatgacaaa tgttggtgaa 300

cccttccaag cttatagctc agtttatgac gcatgtggtg cccaagctaa aatgttacgt 360

gcttcatcat attattctgg ggcttggcgt gaaaatacaa gttcttactt agatgcgaca 420

45

gcttggcttg aaggacgtta tgccacggat ccaacttatg cttctaaatt gaatagcgtg 480

atctctgaac ttggtttaag tgtttatgac caaggaggag aaatatcagg aggaactgct 540

50

gttacaacta gttcatcagc ctcaacaaat tcagctggca catacaaagt acaagagggg 600

gattcattat cagcaatcgc tgctcaatat ggtacaactg ttgatgcact tgtgtcagca 660

aatagtttag aaaatgcgaa cgatattcat gtaggagaag ttttgcaagt tgctgggtgct 720

55

agcacaacta caacaagtac caatacaact tccaatgtat cgtcaagttc tacttatacc 780

gtcaaatcag gagatagttt atattcgatt gcggaacaat atggaatgac tgtttcatca 840

ctgatgtcag ccaatggaat ttatgatggt aattcaatgc ttcaagtagg acaagtattg 900

60

caagtaactg taagtactag tgcaacaact tcaaacacaa cgacttcaaa cagttataca 960

attcaaatg gtgacagcat ttattcaatt gccacagcaa atgggatgac agctgaccaa 1020

65

ttagcagccc tcaatggatt tggaattaat gacatgattc atccaggaca acaattaga 1080

atctaa 1086

70

<210> 3  
 <211> 1011

ES 2 678 699 T3

5 <212> ADN  
 <213> Lactococcus lactis

<400> 3

10 atggtagtta aagttggtat taacggtttc ggtcgtatcg gtcgtcttgc tttccgtcgt 60  
 attcaaaatg ttgaagggtg tgaagttggt gcaatcaacg acttgacaga tccagcaatg 120  
 cttgctcact tgcttaaata cgatacaact caaggtcgtt ttgatggtaa agttgaagtt 180

15 aaagatgggtg gttttgaagt taacggtaaa ttcgttaaag ttactgctga atctaacca 240  
 gctaacatca actgggctga agttggtgca gaaatcgttc ttgaagcaac tggtttcttc 300  
 gcaactaaag aaaaagctga acaacacttg cacgctaacg gtgctaaaaa agttgttatac 360

20 actgcacctg gtggatctga tgttaaaaca atcgttttca aactaacca cgaagtactt 420  
 gatggaactg aacagtaat ttcagctggt tcatgtacaa ctaactgtct tgctccaatg 480

25 gctgatactt tgaacaaaca attcggatc aaagttggta caatgactac agttcacggt 540  
 tacactggtg accaaatgac tcttgatggc ccacaccgtg gtggagactt ccgtcgcgca 600  
 cgtgctgcag ctgaaaacat cgtacctaac tcaacagggtg ctgctaaagc tatcgggtctt 660

30 gtattgccag aacttcaagg taaacttcaa ggacatgctc aacgtgtacc agttccaact 720  
 ggttcattga ctgaacttgt tactatcctt aacaaagaag ttacagttga cgaaatcaac 780

35 gcagctatga aagctgcttc aatgaatca tttggttaca acgaagacca aatcgtttca 840  
 tctgatatcg ttggtatctc aaactcttca ctctttgatg ctactcaaac tgaagttact 900  
 tcagctgatg gagctcaact tgttaaaact gtatcttggg acgataacga aatgtcatac 960

40 acttcaaacc ttgttcgtac acttgcatac ttcgctaaaa tcgctaaata a 1011

<210> 4  
 45 <211> 1419  
 <212> ADN  
 <213> Lactococcus lactis

<400> 4

50 atggttggtg gtgcacaagc aacagaagtt gatttggttg ttattggttc aggcctcgtt 60  
 ggttatggtg cagccatcgc tgcggctgaa cttggtaaaa aagttacaat tattgaaaaa 120  
 gataatggtg gtggggtttg tttaaatatt ggttgatcc catcaaaaagc attgattaat 180

55 attggtcatc attaccaaga atctttggag gaagaaaaag gagaaaatcc ttttgggtctt 240  
 tctgtcggaa atgttaaatt aaactgggaa tctgcccaaa aatggaaaca agataaagtt 300

60 gtcaaccagt tgacagggtg tgttaaaatg ctacttaaaa aacacaaagt tgacgtgatt 360  
 caaggaactg cagaatttat tgataacaat acaataaatg ttgaacaaga agatgggttc 420  
 caacttttgc aatttaatga tgtgattatc tcaactgggt cacgtcctat cgaaattcct 480

65 tctttcccat ttggtggtcg cattattgac tctactggtg ctttgtcact tccagaagtt 540  
 cctaaacatt tgattattgt tgggggagga gttattggtt ctgagcttgg tggagcatac 600

70 cgtatgctcg gttctaagat tacaattggt gaaggtttgg accacathtt aaacgggttt 660

## ES 2 678 699 T3

5	gataaagaaa tgtctgatat cattgctaataat cgcgttaaat ctgctggttc tgaatatcttt	720
	acttcagcaa tggctaaatc agctactcaa actgataaag atgtaacttt gacttttgag	780
	gttgacggaa aagaacaaac ggtgactggt gattacttac tegtctctgt tggacgtcgt	840
10	ccaaatactg atttaatcgg cttgaacaac actgatgtta aattgactga ccgtggtttg	900
	attgaagttg acgattctta tgcaactaat gttcctcaca tttatgcaat cggatgatgtg	960
15	gttcctgggc caatgctcgc tcacaaagct tctttccaag ctaaagttgc tgctgctgcg	1020
	attgctggag ctgaggacga cgtggactta cacgttgctt tgctgctgt agcttataca	1080
	acaactgaat tagcaacagt tggagaaaac cctgaatcag ttaaagaccg taaagatggt	1140
20	aaaatttcta agttcccatt tgctgcaaat ggccgtgcca tttcaatgaa tgatcgcact	1200
	ggtttcttac gtttgattac tgaactaaa gaaggggct taatcgggtc tcaaatcgtt	1260
25	ggccctgggtg catctgactt gatttctggt ttatcactag cgattgaaaa tggattgact	1320
	tctaaagaca tttcattgac tatccaacct cacccaacac ttggtgaagc gattatggat	1380
30	acagctgaat tggctgatgg cttaccaatt cacgtttaa	1419
	<210> 5	
	<211> 1311	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Lactococcus lactis</i>	
	<400> 5	
	atgacagtaa catcagattt cacacaaaaa ctctacgaaa attttgcaga aaatacaaaa	60
40	ttgcgtgagg tggaaaatgc cgtgactaaa aatggtttgc tttcatcact cgaagtccgt	120
	ggttcacatg cagcaaattt gcctgagttt tcaattgact tgacaaaaga ccctgtaacg	180
	aatcaaaaac aatctggtcg ttgctggatg tttgctgctt tgaacacttt ccgtcataaa	240
45	tttatcaatg aatttaaaac agaggatttt gagttttcac aagcttacac tttcttctgg	300
	gataaatatg aaaaatcaaa ctggttcacg gaacaaatta ttggtgatat tgaatggac	360
50	gatcgtcgtt tgaattcctt tttacaaaca ccacaacaag atggcggcca atgggatatg	420
	atggttgcaa tttttgaaa atatggaatt gttcccaaag ctgtttatcc tgaatcacia	480
	gcttcaagta gctcacgtga attgaatcaa tacttgaata aactactccg tcaagatgct	540
55	gaaattttgc gttatacaat tgagcaaggt ggagatggtg aagcagttaa agaagaactt	600
	ttgcaagaag tctttaattt ccttgcggta actttagggt tgccaccaca aaattttgaa	660
60	tttgctttcc gtaataaaga taatgaatac aaaaaatttg ttggtagtcc aaaagaattt	720
	tacaatgaat atgttggaat tgatttgaat aattatgtgt cagtaatcaa tgctccaact	780
	gctgacaaac cttataataa gagctacaca gttgagtttc ttggaaatgt tgcggtgggt	840
65	aaagaagtga aacatttgaa tgttgaatg gaccgcttta aaaaattggc cattgcccaa	900
	atgcaagctg gtgaaacagt ttggtttggt tgtgacgtgg gtcaagaatc aaatcgttca	960
70	gcaggacttt tgacaatgga ttcttatgat ttcaaatctt cattggatat tgaatttact	1020

## ES 2 678 699 T3

5	caaagcaaag caggacgtct tgactatggt gagtcggtga tgacgcatgc catggtttta	1080
	gcgggtggtg atttagatgc tgacggaaat tcaactaaat ggaaagtga aaattcatgg	1140
	ggtaaagatg cgggtcaaaa aggatatfff gttgcctctg atgaatggat ggatgaatat	1200
10	acttatcaaa ttggtgtccg taaagacctt ttaactgaag aagaattggc tgcttacgaa	1260
	gagaaacctc aagtacttct accatgggac ccaatgggtg ctttagctta a	1311
15	<210> 6 <211> 648 <212> ADN <213> Lactococcus lactis	
20	<400> 6 atgaaaaata aaattttaga cctgagggca tattttattg ctggcccaca agattttcca	60
	aaactttcaa ttgatgatgc aatcgataaa atttctgtaa tcataaaaag tggagtaacg	120
25	gtttatcaat ttcgtgataa gggacaatt tataaaaata aaaatcaacg attagaagta	180
	gcaaaaagac tacaagaagt agctcagaaa gcggctgttt cttttattgt gaatgatgat	240
30	gttgaattag cgcgtgaatt gtcagctgac gggattcatg tcggacaaga cgatgattct	300
	gtcagtaaaa ttcgtgagct gattggccaa gaaatgtggg taggactttc tgtcagtaat	360
	gatatggaat tagaaagcgc tcaaaagagt ggggctgact atttgggaat tggccaatt	420
35	tatccaacaa atagcaagtc cgacgcagca gaaccaattg gggttgacca ttaagaaaa	480
	atgcttgagc ataactcaatt accaactggt ggaattgggtg gaattactga aaattcactg	540
40	acagagcttt caaaaattgg tctgggtgga gttgcggtaa tttctttgct gacagaatcc	600
	gaaaattaca aaaatatggt tcaaaaaatt aagcaaaata ttagatga	648
45	<210> 7 <211> 1623 <212> ADN <213> Lactococcus lactis	
50	<400> 7 atgaaacaac cactttataa tacaggagtt ttatttaaga ctttaataaa aagggattgg	60
	tttaagttag tttctggat tttaggaatg cttgcttttg ctgcttcagg ggcagggaaa	120
55	atggaagtgg cctcgaatcc ggcgacggct agtactcttt atacaatggt tgtcaaaaat	180
	ccagcaatgg tcggattatt tggaccaact ccaataaata atccaactaa ttatagtctg	240
	gggccgattt ttggtcaaac catgacttta attacggggc tgactttcgc tatcatttgc	300
60	attatttatg ttgttaatcg aagcagaaaa gaagaagatg atgggattac agaacttttt	360
	cggtcttact ctattgaaa attggcaaat acgactgctt tagtcatgga acttttgctc	420
65	ttaaatttaa taatggctgt cttattagct ctttcaatag aggtccaaaa cgtggctggc	480
	ttgaatcatt tagaaagtaa tttctatatt gctttcacia caagcgtca gggtttctt	540
	tggggaatgt ttgctttact tttcggtaaa attttctctg aagcaagtac aactaaaggg	600
70	atgacatttg gtttactggg tttgttatat attgttcgaa tgctaacaga tgtaacaaat	660

# ES 2 678 699 T3

5	ctttccatag gttggttcaa tcctctgtct tggctttatc tagcttttcc atatgttaaa	720
	ggatcatgaaa attggttagc tgtctttttg acttttctct tagcttttct aatttttagga	780
10	atatcctata ttctagagct taaaagagat gtgggagtgg ggtattttcc cgaaagaaag	840
	gcgcgacttc atgggaaaaa gggacatttc ggatttcctg gtctcgtttt gaatcttgaa	900
15	aaaaagatga ttatcggttg gcttttgcca agttttgttc tgggcttagt ttatggttca	960
	atgtttgac aatggacca atttatttca agtaataaaa ccgttaagga gctttttggt	1020
	gggaatgaaa cggcagcgag tgcgattaga ggaaacttca tggctactct gttttcgata	1080
20	ttgtcaatct taatcgagc gtttgggtga attttactga caaaaatggt gagcgaggaa	1140
	agaaaaaatc gtctggaagc tctttatgct ttaccacttt cacgactaaa agtgtattcc	1200
25	acttatttac tgatagctat tctgtcagta attttagctc agtttttagc gctttttgga	1260
	atatttattg aacagttggg taataaaaat gctttgagct tcttagaaat tatgaaatct	1320
	ggcatgattt ggcttgttgc tgtcatattt gttttagcaa tacttagtct gttacttggg	1380
30	cttgtgcctc gtttggcaga attaatttgg gtatatcttg ctttcttact ttttatgact	1440
	tatcttgga aattattatc tttgccaaaa tggcttgaaa atttaagcat ttataactat	1500
	attcctaaat tgccagttga gaaaatgaat cttcctaccg ttttattcat attaatttta	1560
35	tctgtcttct tagttttact tggctttgga gcttatagaa gacgcgattt aatcacgggg	1620
	taa	1623
40	<210> 8 <211> 1116 <212> ADN <213> Lactococcus lactis	
45	<400> 8 atggctttaa cagcaggtat cgttggttta ccaaacgttg gtaaatcaac tctttttaat	60
	gcaattacaa aagcaggcgc agaagctgca aactatcctt ttgcaacaat tgacccaaat	120
50	gttgggatgg tagaagtacc ggatgaacgt ttaacaagt taacagagtt gattaaacct	180
	aagaaaactg ttccgacaac ttttgaattt acagatattg ctgggattgt taaaggggct	240
55	tcacgcggag aaggtctagg aaataaattt cttgccaata ttcgtgaagt agatgccatc	300
	attcacgttg ttcgagcttt tgatgatgaa aatgtaatgc gtgaaaataa tctggaagat	360
	gcttttattg atccaatggc agacattgaa acaattaatc ttgaattaat tttggccgat	420
60	ttagaatcag tcaataaacg ttatgcgcgt gttgaaaaag ttgctcgtac ggcaaaagat	480
	aaagatgogg tcgcagaatt taatgttttg aaaaagctca aaccgggtact tgaagatggt	540
65	aatcagcac gaacaattga ctttgacgaa gatgaaataa aggttcttaa aagcttgttc	600
	ttattgacaa gtaaaccagt tctttatgta gctaagtgtt cagaagatga agtaggcgaa	660
	cctgataata tcgaatacgt gaaacaaatt cgtgagtttg cggcgactga aatgctgaa	720
70	gttgcgtgga tttctgctcg tgttgaagaa gaaatctcag agttggaaga tgatgaaaaa	780

## ES 2 678 699 T3

5	gcagaat tttt tggaagcaat tggcttaaaa gaatctggtg ttgatatggt gactcgtgca	840
	gcttaccacc ttcttgact tgccacttac tttactgctg gtgaaaaaga agtccgtgct	900
10	tggaccttca agcgtggaat gaaagctcca caaatggcag gaattattca tacagacttt	960
	gaaaaaggct ttatccgctg agtaactatg tcttatgatg atttgcttaa atacggttca	1020
15	gaaaaagctg ttcgtgaagc cggctgcttg cgtgaagaag gaaaagaata tgttgggtcaa	1080
	gatggcgaca ttatggaatt ccgtttcaac gtgtaa	1116
	<210> 9	
20	<211> 411	
	<212> ADN	
	<213> Lactococcus lactis	
	<400> 9	
25	atggatcgtt atactaaaa agtcattgct tgggatttag gaaagcgaat gactctagaa	60
	ttagtcaaaa ggactttgaa taaggcaatg gaatcacaaa attatccaga agctgtgatg	120
30	cttcattctg accaaggaag tcagtatacg agtcatgagt atgaagagac aataaaaaac	180
	tctggaatga ctactcctt cagtcgtaag ggctatcctt atcataatgc cagtcttgaa	240
	tcttggcatg gacatttaaa aagagagtgg gtgtatcaat ttaaataaa gaactttgaa	300
35	gaagcctatc agagtat ttt ctggtacatc gaagcctttt ataattcaaa acgaatccat	360
	caaagttag ggtatcttac gcctaataca tttgaaaaag aatcactta a	411
	<210> 10	
40	<211> 645	
	<212> ADN	
	<213> Lactococcus lactis	
	<400> 10	
45	atgataagaa gtgaatgtct caaattaaaa aatagcttag ggttttat ttt agtttttctc	60
	tttactttat tagagctttt aacggttctt atttatttag cttttggaag aagtcatggt	120
50	tcaatgactg atttatcgct catgat tttt ttgttttttc cgttactggt tacaattttg	180
	tctattctaa tctttgaaca ggagagtctg gccaatcggt tccaagaaat aaatgtaaat	240
	aaaaaaagta gcagaatttg gttatcaaag ctaatagtag tggatttctt tttgttcttt	300
55	ccatcagcaa tgatctggat aattacggga gtttcacagg cagtagggca acaaggaatg	360
	atgatcgcaa cagctagctg gttgatggca atttttctta atcattttca tcttttattg	420
60	acctttataa tcaatcgagg agggagcatg attatcgca ttattgaaat attactcatt	480
	atttttgcca gtaataaagt tttattagca gcttattggg gtcccattgc tttacctggt	540
	aattttatga taactgggct gtgtgcttat ctgatagctg ccgtaggggtg gattgtttta	600
65	tccacaataa ttctttagc attatctaaa aaaaagatta gataa	645
	<210> 11	
70	<211> 729	
	<212> ADN	

ES 2 678 699 T3

5 <213> *Lactococcus lactis*  
 <400> 11  
 atgaaaagaa taatagcatc agaagcaata aaattaaaa aatcaggaac tcttagattg 60

10 gtattaatta tcccttttgt gactctatct atagcatttc ttatgggtgg aatacagatt 120  
 ttttagtgttt tttcaattta ttggtgggaa actgggtttt tattcctttt gatgagtttg 180  
 ctttttcttt atgatataaa atcagaggag caagctggaa attttcaaaa tgtgaaatgg 240

15 aaaaagctga gttggaaaat tcatttggcc aaaatgttgt tgatttggct aagaggtata 300  
 cttagcgagca tagtcttgat ttttttgctt tttttggttg cttttgtggt tcaaggtatt 360

20 gtagtgggtgg attttatgaa agtaagtgtg gcattgattg ctatattact agcagcttct 420  
 tggaaatttac cttttatata cttgatcttc aagtggatta atacttacgt attgttagct 480  
 gcgaatacct tgatttgttt aattgttgcc ctttttgttg cacaaactcc agtatggttc 540

25 ttgctaccat acacttatca ctataaagtt acagaaagtt tgttaaatat caaacatca 600  
 ggagatttgt taacagggaa gataaatttc agtatttggg aagttttatt accatttggg 660

30 ctttccatag ttgtaacgat aggagtctcg tatttactta aaggagtgat agaacatgat 720  
 aagaagtga 729

35 <210> 12  
 <211> 678  
 <212> ADN  
 <213> *Lactococcus lactis*

40 <400> 12  
 atgcaggtaa aaattcaaaa tctttctaaa acatataaag aaaagcaggt gctacaagat 60  
 atcagttttg atattaaatc tggaacagtc tgtggtttat taggagttaa cgggtgcagga 120

45 aaatcaactt tgatgaaaat tttgtttggt ttaatttctg cagatactgg aaaaattttt 180  
 tttgatggac aagaaaagac aaataatcaa cttggagcct taatcgaggc tccagcaata 240  
 tataatgaatt tatctgcttt cgataatctt aaaactaagg ctttgctttt tggaaattca 300

50 gataagagaa tcatgaaac tctagaagtg attggtttgg cagaaacagg aaagaaaaga 360  
 gcaggaaaat tctcttttagg gatgaaaca cgtttgggaa ttggtatggc tattcttaca 420

55 gaacctcaat ttttaattct tgatgaacct actaatggtt tggatcctga tggatttgcg 480  
 gagttgtaa acttaatctt aaaacttaaa gctaaaggtg tgacaatctt gatttctagt 540  
 catcagttgc acgaaataag taaagtagct agtcaaatta ttattttgaa caaaggtaa 600

60 attcgttata atcgtgcgaa caataaagaa gacgacattg aacagttatt cttaagatt 660  
 gtgcatggag gaatgtga 678

65 <210> 13  
 <211> 687  
 <212> ADN  
 <213> *Lactococcus lactis*

70 <400> 13

## ES 2 678 699 T3

5	gtgtataaaa ttttaatagt tgatgatgat caggaaatth taaaattaat gaagacagca	60
	ttagaaatga gaaactatga agttgagagc catcaaaaca tttcacttcc cttggatatt	120
	actgatthtc agggatthga tttgatthtg ttagatatca tgatgtcaaa tattgaaggg	180
10	acagaaatth gtaaaaggat tgcagagaaa atatcaactc caattatctt tgttagtgcg	240
	aaagatacag aagaggatat tataaacggc ttaggtattg gtggggatga ctatattact	300
15	aagcctthta gccttaaaaca gttggttgca aaagtggaag caaatataaa gcgagaggaa	360
	cgcaataaac atgcagttca tgtthtttca gagattcgta gagatttagg accaattaca	420
	thttatthtag aagaaagggc agtctgtgtc aatggtcaaa caattccact gacttgtcgt	480
20	gaatacagata thcttgaatt actatcacia cgaacttcta aagthtatac gagagaggat	540
	atthtatgatg acgtatatga tgaatattct aatgcactth ttcggtcaat ctcgagat	600
25	atthtatcaga ttaggagtaa gthtgacca tacgatatta atccgataaa aacggttcgg	660
	ggacttgggt atcagtgga tgggtaa	687
30	<210> 14 <211> 1344 <212> ADN <213> Lactococcus lactis	
35	<400> 14 atgggtaaaa aatattcaat gcgtcagagg atatggcaag ctgtcattga aattatcata	60
	ggtacttgtc tacttatcct gthgttactg ggcttgactt tctttctacg acaaattgga	120
40	caaatcagtg gthcagaaac tathcgttha tctthtagatt cagataatth aactatthct	180
	gatatcgaac gtgatatgaa aactaccca tatgattata thattthtga caatgatata	240
	agtaaaatth tgggaggaca thatgtcaag tccgatgtac ctagtthtgt agcttcaaaa	300
45	cagthctcac ataatattac agaaggagaa thacttata cthattcaag caataagcat	360
	thttcagthg thttaagaca aaacagthg cthgaatth caaatcatac gcttcttca	420
50	atthcttata atcaatthac thacctthtc thttthcttg gtgaaataat actcattatt	480
	thttctgtct atcatctcat tagagaatth tctaagaatt thcaagccgt tcaaaagatt	540
	gcattgaaga tgggggaaat aactactth cthgaacaag aggaatcaaa aattattgaa	600
55	thtgatcagg thctgaataa cthtatthcg aaaagthaag agthtagctth cthattgaa	660
	gcggagcgtc atgaaaaaca tgatttatcc thccagthg ctgcactth acatgatgt	720
60	aagacactth taacagthac aaaaggaaat thtgaactgc tagagatgac tgaagthaat	780
	gaacaacaag ctgattthac tgagthcaatg aaaaatagth tgactgthtt tgacaagth	840
	thtaacacia tgattagth taaaaactth thgaatgatg aaaaatgatha caaagcga	900
65	atctccctgg aggaththtt gatagatth tcagtthgag thgaagagth gtcaacaact	960
	tatcaagthg atthacgct agthaaaaaa acagatthaa cactththta cggaaatata	1020
70	thtagctthaa gthcagcact tatcaatath thgtthaatg cthgtcagth tgctaaag	1080

## ES 2 678 699 T3

5	ggtgaaaaaa tagtcagttt gagtatttat gatgatgaaa aatatctcta ttttgaaatc	1140
	tggaataatg gtcacacctt ttctgaacaa gcaaaaaaaaa atgctggaaa actatctttc	1200
	acagaagata ctggacgtag tgggaaacac tatgggattg gactatcttt tgctcaaggt	1260
10	gtagctttta aacatcaagg aaacttaatt ctacagtaatc ctcaaaaagg tggggcagaa	1320
	gttatcctaa aaataaaaaa gtaa	1344
15	<210> 15 <211> 2010 <212> ADN <213> Lactococcus lactis	
20	<400> 15 ttgggtttat cagcaactgt gcatggggag acaacaaatt cacaacagtt actctcaaat	60
	aatattaata cggaattaat taatcataat tctaatagcaa ttttatcttc aacagagggg	120
25	tcaacgactg attcgattaa tctaggggag cagtcacctg cagtaaaatc gacaacaagg	180
	actgaattgg atgtaactgg tgctgctaaa actttattac agacatcagc tgttcaaaaa	240
30	gaaatgaaag tttcgttgca agaaactcaa gttagttctg aattcagtaa gagagatagc	300
	gttacaataa aagaagcagt tccagtatct aaggatgagc tacttgagca aagtgaagta	360
	gtcgtttcaa catcatcgat tcaaaaaaat aaaatcctcg ataataagaa gaaaagagct	420
35	aacttcgtta cttcctctcc gcttattaag gaaaaacat caaattctaa agatgcatct	480
	gggtgaattg ataattctgc ttctcctcta tcttatcgta aagctaagga agtggtatct	540
40	cttagacaac ctttaaaaaa tcaaaaagta gaggcacaac ctctattgat aagtaattct	600
	tctgaaaaga aagcaagtgt ttatacaaat tcacatgatt tttgggatta tcagtgggat	660
	atgaaatatg tgacaaataa tggagaaagc tatgctctct accagccctc aaagaaaatt	720
45	tctgttgga ttattgattc agaatcatg gaagaacatc ctgatttgtc aaatagttta	780
	ggaaattatt ttaaaaatct tgttcctaag ggagggttg ataatgaaga acctgatgaa	840
50	actggaaatc caagtgatat tgcgacaaa atgggacacg ggacggaagt cgcaggctcag	900
	attacagcaa atggtaatat tttaggagta gcaccagggg ttactgtaaa tatatacaga	960
	gtatttggtg aaaatctttc gaaatcggaa tgggtagcta gagcaataag aagagctgag	1020
55	gatgatggga acaaggtcat caatataagt gctggacagt atcttatgat ttcaggatcg	1080
	tatgatgatg gaacaaatga ttatcaagag tatcttaatt ataagtcagc aataaattat	1140
60	gcaacagcaa aaggaagtat tgttgctgca gctcttggtg atgatagttt aaacatacaa	1200
	gataacccaa caatgataaa ctttcttaag cgtttcagaa gtataaagggt tcctggaaaa	1260
	gtttagatag caccgagtggt atttgaggat gtaatagccg taggtggaat agatggttat	1320
65	ggtaaatatt ctgattttag taatattgga gcggatgcaa tttatgctcc tgctggcaca	1380
	acggccaatt ttaaaaaata tgggcaagat aaatttgcca gtcagggtta ttatttgaaa	1440
70	gattggcttt ttacaactac taactctggc tggtagcaat atgtttatgg caactcattt	1500

## ES 2 678 699 T3

5	gctactccta aagtatctgg ggcactggca ttagtagttg ataaatatgg aataaagaat	1560
	cctaaccaac taaaaagggt tcttctaatag aattctccag aagttaatgg gaatagagta	1620
	ttgaatattg ttgatttatt gaatgggaaa aataaagcct ttagcttaga tacagataaa	1680
10	ggtcaggatg atgctattaa acataaatcg atggagaatc ttaaagagtc tagggataca	1740
	atgaaacagg aacaagataa agaaattcaa agaaatacaa ataacaattt ttctatcaaa	1800
15	aatgattttc ataacatttc aaaagaagta atttcagttg attataatat taatcaaaaa	1860
	atggctaata atcgaaattc gagaggtgct gtttctgtac gaagtcaaga aattttacct	1920
	gttactggag atggagaaga ttttttaccg gcttttaggta tagtgtgtat ctcaatcctt	1980
20	ggtatattga aaagaaagac taaaaattga	2010
	<210> 16	
25	<211> 738	
	<212> ADN	
	<213> <i>Lactococcus lactis</i>	
	<400> 16	
30	atgagaagat atttaatact tattgtggcc ttaatagga taacaggttt atcagggtgt	60
	tatcaaaaaa gtcataaaaa ggtgaggttt gacgaaggaa gttatactaa ttttatttat	120
	gataataaat cgtatttctg aactgataag gagattcctc aggagaacgt taacaattcc	180
35	aaagtaaaat tttataagct gttgattggt gacatgaaaa gtgagaaact tttatcaagt	240
	agcaacaaaa atagtgtgac tttggtctta aataatattt atgaggcttc tgacaagtcg	300
40	ctatgtatgg gtattaacga cagatactat aagatacttc cagaaagtga taagggggcg	360
	gtcaaagcct tgagattaca aaactttgat gtgacaagcg atatttctga tgataatttt	420
	gttattgata aaaatgattc acgaaaaatt gactatatgg gaaatattta cagtatatcg	480
45	gacaccaccg tatctgatga agaattggga gaatcagc atgttttagc tgaagtacgt	540
	gtgtttgatt cagttagtgg caaaagtatc ccgaggtctg aatgggggag aattgataag	600
50	gatggttcaa attccaaaca gagtaggacg gaatgggatt atggcgaaat ccattctatt	660
	agaggaaaat ctcttactga agcatttgcc gttgagataa atgatgattt taagcttgca	720
	acgaaggtag gaaactag	738
55		
	<210> 17	
	<211> 1245	
	<212> ADN	
60	<213> <i>Lactococcus lactis</i>	
	<400> 17	
	atgaataaaa aaaatataaa aagaaatggt gaaaaatta ttgctcaatg ggatgagaga	60
65	actagaaaaa ataaagaaaa cttcgatttc ggagagtga ctctctctac aggattgctt	120
	ggtataatth taatgttagc ggagttaaaa aataaagata actcaaagat atacagaaa	180
	aagatagaca attatattga atatattggt agcaaacctt caacatatgg gcttttaaca	240
70	ggatcacttt attcgggagc agctggcatt gcattaagta tcctacattt acgagaagat	300

ES 2 678 699 T3

5 gacgaaaaat ataagaatct tcttgatagc ctaaatagat atatacgaata tttcgtcaga 360  
 gaaaaaattg aaggatttaa tttggaaaac attactoctc ctgattatga cgtgattgaa 420  
 10 ggtttatctg ggatactttc ctatctatta ttaatcaacg acgagcaata tgatgatttg 480  
 aaaatactca ttatcaattt tttatcaaat ctgactaaag aaaacaatgg actaatatcg 540  
 15 ctttacatca aatcggagaa tcagatgtct caatcagaaa gtgagatgta tccactaggg 600  
 tgtttgaata tgggattagc acatggactt gctggagtgg gctgtatctt agcttatgcc 660  
 cacataaaag gatatagtaa tgaagcctcg ttgtcagctt tgcaaaaaat tatttttatt 720  
 20 tatgaaaagt ttgaacttga aaggaaaaaa cagtttctat ggaaagatgg actttagtgc 780  
 gatgaattaa aaaaagagaa agtaattagg gaagcaagtt tcattagaga tgcattggtgc 840  
 25 tatggaggtc caggtattag tctgctatac ttatacggag gattagcact ggataatgac 900  
 tattttgtag ataaagcaga aaaaatatta gagtcagcta tgcaaaggaa acttgggtatt 960  
 gattcatata tgatttgcca tggctattct ggtttaatag aaatttgttc tttatttaag 1020  
 30 cggctattaa atacaaaaaa gtttgattca tacatggaag aatttaatgt taatagtggag 1080  
 caaattcttg aagaatacgg agatgaaagt ggcacggggt ttcttgaagg aataagtggc 1140  
 35 tgtatactgg tattatcgaa atttgaatat tcaatcaatt ttacttattg gagacaagca 1200  
 cttttacttt ttgacgattt tttgaaagga ggaagagga aatga 1245

<210> 18  
 40 <211> 1803  
 <212> ADN  
 <213> Lactococcus lactis

<400> 18  
 45 atggatgaag tgaagaatt cacatcaaaa caatttttta atactttact tactcttcca 60  
 agcaccttga agttaatttt tcagttggaa aaacgttatg caatttattt aattgtgcta 120  
 50 aatgctatca cagcttttgt tccgttggct agtcttttta tttatcaaga ttttaataaac 180  
 tctgtgctag gttcagggag acatcttatac aatattatta tcatctattt tattgttcaa 240  
 gtgataacaa cagttctggg acagctggaa agttatgtta gtggaaaatt tgatagcga 300  
 55 ctttcttaca gtatcaatat ggcctcatg aggactacct catctcttga attaagtgat 360  
 tatgagcagg ctgatatgta taatatcata gaaaaagtta ctcaagacag cacttacaag 420  
 ccttttcagc tatttaatgc tatcattggt gtgctttcat cgtttatctc attgttatct 480  
 60 agtctatttt ttattggaac atggaacatt ggggtagcaa ttttactcct tattgttcca 540  
 gtattatctt tggacttttt tctcagagtg ggacaattag agtttttaat ccagtggcag 600  
 65 agagcaagtt ctgaaagaga aacatggat attgtatatt tattgactca tgatttttca 660  
 tttaaagaaa tcaagttaaa taatattagc aattacttca ttcataaatt tggaaaatta 720  
 70 aagaaaggat ttatcaacca agatttagct attgctcgta agaagacata tttcaatatt 780  
 tttcttgatt tcattttgaa tttgataaat attcttacga tatttgctat gatcctttcg 840

# ES 2 678 699 T3

5	gtaagagcag gaaaacttct tataggaat ttggaagtc tcatacaagc tatttctaaa	900
	atcaatactt attctcaaac aatgattcaa aatatttaca tcatttataa tactagtttg	960
10	tttatggaac aactttttga gtttttaaag agagaaagtg tagttcacia aaaaatagaa	1020
	gatactgaaa tatgcaatca acatatagga actgttaaag taattaattt atcatatggt	1080
15	taccctaatt cgaatgcctt tgcactaaag aatatcaatt taccctttga aaaaggagaa	1140
	ttaactgcta ttgtaggaaa aatgggttca gggaaaagta cactagtaaa gataatttca	1200
	ggattatata aaccaactat gggaaataat caatacgaca aatgagaag tagtttgatg	1260
20	cctgaggagt ttatcagaa aaacatatcg gtgctgttcc aagattttgt gaagtatgag	1320
	ttaacgataa gagagaatat aggattgagt gatttgcctt ctcaatggga agatgagaaa	1380
25	attattaaag tactagataa tttaggactc gattttttga aaactaata tcaatatgta	1440
	cttgatacgc agttaggaaa ttggtttcaa gaaggcatc aactttcagg aggtcagtgg	1500
	caaaaaattg cattagcaag gacattcttt aagaaagctt caatttatat tttagatgaa	1560
30	ccaagtgctg cactcgatcc tgtagctgaa aaagaaatat ttgattattt tgttgcctt	1620
	tcggaaaata atatttcaat tttcatttct catagtttga atgctgccag aaaagcaaat	1680
35	aaaatcgtgg ttatgaaaga tggacaggtc gaagatggtg gaagtcatga tgccttctg	1740
	agaagatgtc aatactatca agaactttat tattcagagc aatatgagga taatgatgaa	1800
	taa	1803
40	<210> 19 <211> 2982 <212> ADN <213> Lactococcus lactis	
45	<400> 19	
	atgataaaaa gttcatttaa agctcaaccg tttttagtaa gaaatacaat ttatctcca	60
50	aacgataaac ggagttttac tgaatatact caagtcattg agactgtaag taaaaataaa	120
	gtttttttgg aacagttact actagctaact cctaaactct atgatgttat gcagaaatat	180
	aatgctggtc tgttaaagaa gaaaagggtt aaaaattat ttgaatctat ttacaagtat	240
55	tataagagaa gttatttacg atcaactcca tttggattat ttagtgaaac ttcaattggt	300
	gttttttcga aaagttcaca gtacaagtta atgggaaaga ctacaagggt tataagattg	360
	gatactcagt ggttgattcg cctagttcat aaaatggaag tagatttctc aaaaagtta	420
60	tcatttacta gaaataatgc aaattataag tttggagatc gagtttttca agtttatacc	480
	ataaatagta gtgagcttga agaagtaaat attaaatata cgaatgttta tcaaattatt	540
65	tctgaatttt gtgagaatga ctatcaaaaa tatgaagata tttgtgaaac tgtaacgctt	600
	tgctatggag acgaatatag agaactatcg gaacaatatac ttggtagtct gatagttaat	660
	cattatttga tctctaattt acaaaaagat ttgttgcag attttcttg gaacactttt	720
70	ttgactaaag ttgaagcaat agatgaagat aaaaaatata taattcctct gaaaaagtt	780

# ES 2 678 699 T3

5	caaaagttta ttcaagaata ctcaagaata gaaattggtg aaggtattga gaaactgaaa	840
	gaaatatatc aggaaatgtc acaaattcctt gagaatgata attatattca aattgattta	900
10	attagtgata gtgaaataaa ttttgatggt aaacaaaagc aacaattaga acatttagct	960
	gagtttttag gaaatacgac aaaatctgta agaagaacat atttggatga ctataaggat	1020
15	aaatztatcg aaaaatatgg tntagatcaa gaagtacaaa taacagaatt atttgattct	1080
	acatttggca taggagctcc atataattat aatcatcctc gaaatgactt ttatgagctc	1140
	gaaccgagta ctctatacta ttcagaagag gagagagaaa agtacctcag catgtatgta	1200
20	gaagccgtta aaaatcataa tgtaattaat cttgacgact tagagtctca ttatcaaaaa	1260
	atggacttag aaaagaaaag tgaacttcaa gggttagaat tatttttgaa tttggcaaag	1320
	gagtatgaaa aagatatttt tatttttaggg gatatcgttg gaaataataa tttgggaggg	1380
25	gcatcaggta gattttctgc actctctcgc gagttaacaa gttatcatag aacgatagta	1440
	gattctgtcg aaagagaaaa tgagaataaa gaaattacat cgtgtgaaat agtatttctt	1500
30	ccagaaaata tcagacatgc taacgttatg catacatcaa ttatgaggag gaaagtactt	1560
	ccatttttta caagtacaag tcacaatgaa gttctgttaa ctaatatcta tattggaata	1620
	gacgaaaaag aaaaatttta tgcacgagac atttcaactc aagaggtatt gaaattctac	1680
35	attacaagca tgtacaataa aacgttattc agtaatgagc taagatttct ttacgaaatt	1740
	tcattagatg acaagtttgg taatttacct tgggaactta tttacagaga ctttgattat	1800
40	attccacggt tagtatttga cgaaatagta atatctcctg ctaaatggaa aatttgggga	1860
	agggatgtaa atagtaagat gacaataaga gaacttattc aaagcaaaga aattcccaaa	1920
	gagttttata ttgtcaatgg agataataaa gtttatttat cacaggaaaa cccattggat	1980
45	atggaaattt tagagtcggc gataaagaag agctcaaaaa gaaaagattt tatagagcta	2040
	caagaatatt ttgaagatga aaatatcata aataaaggag aaaaggggag agttgccgat	2100
50	gttgtagtgc cttttattag aacgagagca ttaggtaatg aagggagagc atttataaga	2160
	gagaaaagag tttcggttga acggcgtgaa aaattgcctt ttaacgagtg gctttatcta	2220
	aagttgtaca tttctataaa tcgtcaaaaat gaatttttac tgtcgtatct tccagatatt	2280
55	cagaaaatag tagcaaactt gggtggaat ctattcttcc taagatatac tgatcctaaa	2340
	ccacatatta gattgcgtat aaaatgttca gatttatttt tagcttacgg atctattcct	2400
60	gaaatcttaa aaaggagtcg gaaaaatagg ataatgtcaa cttttgatat ttctatttat	2460
	gatcaagaag tagaaagata tgggtggattt gatactttag agttatccga agcaatattt	2520
	tgtgccgatt ctaaaattat tccaaatttg cttacattga taaaagatac taataatgat	2580
65	tggaaagtcg atgatgtatc aatcttgggtg aattatttat atctgaaatg cttctttcag	2640
	aatgataaca aaaagattct taattttttg aatttagtta gtcctaaaaa ggttaaagaa	2700
70	aatgtcaatg aaaagattga acattatcct aagcttctga aagttaataa tctaggtgac	2760

# ES 2 678 699 T3

5    caaatTTTT atgacaagaa ttttaaagaa ttaaagcatg ccataaaaaa tttatTTTT            2820  
       aaaatgatag ctcaagattt tgaacttcag aaagtttatt caattattga cagtatcatt            2880  
 10    catgtccata ataaccgact aattgggtatt gaacgagata aagagaaatt aatttattac            2940  
       acacttcaaa ggttgtttgt ttcggaagaa tacatgaaat ga                            2982  
  
 15    <210> 20  
       <211> 57  
       <212> PRT  
       <213> Lactococcus lactis  
  
 20    <400> 20  
       Met Ser Thr Lys Asp Phe Asn Leu Asp Leu Val Ser Val Ser Lys Lys  
       1                    5                                    10                                    15  
  
 25    Asp Ser Gly Ala Ser Pro Arg Ile Thr Ser Ile Ser Leu Cys Thr Pro  
                           20                                    25                                    30  
  
 30    Gly Cys Lys Thr Gly Ala Leu Met Gly Cys Asn Met Lys Thr Ala Thr  
                           35                                    40                                    45  
  
       Cys His Cys Ser Ile His Val Ser Lys  
                           50                                    55  
 35  
  
       <210> 21  
       <211> 318  
       <212> ADN  
 40    <213> Lactococcus lactis  
  
       <400> 21  
       atgaatgatt tattttatca tgggctaaag gaactagttg aatcaagtgg taaatctgca            60  
 45    aatcaaatag aaaggaattt gggttaccct agaaattcct tgaataatta taagttggga            120  
       ggagaaccct ctgggacaag attaatagga ctatcagagt attttaatgt gtctccaaaa            180  
       tatctgatgg gtataattga tgagcctaat gacagttctg caattaatct ttttaaact            240  
 50    ctaactcaag aagagaaaaa agaaatgttt ataatttgct aaaaatggct ttttttagaa            300  
       tatcaaatag agttataa    318  
  
 55    <210> 22  
       <211> 768  
       <212> ADN  
       <213> Lactococcus lactis  
 60    <400> 22  
       atgatgaaaa aaggaatttt tgtaattact atagtgatat ctatagcatt gataattgga            60  
  
       ggtttttata gttataattc taggataaat aatctttcaa aagctgataa aggaaaagaa            120  
 65    gttgtaaaaa atagcagtga aaaaaatcag atagacctta cctataaaaa gtattataaa            180  
       aatttaccaa aatcagttca aaataaaata gatgatattt catccaaaaa taaagaagtt            240  
 70    actttaactt gtatttgcca atctgattca gttatttctg aacaatttca acaaaactta            300

## ES 2 678 699 T3

5	caaaaatatt atggaaataa gttttggaac atcaaaaata tcacttaca tggcgaaact	360
	agtgaacaat tattggctga aaaagttgaa aaccaagtat tagcactaa tcctgatgtt	420
	gttttatatg aagctccact ttttaatgat aacaaaaaca ttgaagcaac agcctcactg	480
10	actagtaatg agcaacttat aacaaatttg gctagtgcag gagcggaggt aatagttcaa	540
	ccctctccac cgatttatgg tgggtttgtg taccctgtac aagaagaaca gtttaacaa	600
15	tctttatcta caaagtatcc ctatatagac tactgggcta gttaccaga caaaaattct	660
	gatgaaatga aggggctggt ttctgatgat ggagtatata gaacattaaa tgcttcgggg	720
20	aataaggttt ggctagatta tattactaaa tattttacag caaactaa	768
	<210> 23	
	<211> 780	
	<212> ADN	
25	<213> Lactococcus lactis	
	<400> 23	
	atgcaggaaa cacaggaaca gacgattgat ttaagagggg tttttaaata tattcgaaa	60
30	aggttagggt taatattatt tagtgcttta atagtcacaa tattagggag catctacaca	120
	ttttttatag cctccccagt ttacacagcc tcaactcaac ttgtcgtaa actaccaaat	180
	tcggataatt cagcagccta cgctggacaa gtgaccggga atattcaaat ggcgaacaca	240
35	attaaccaag ttattgttag tccagtcatt ttagataaag ttcaaagtaa tttaaatcta	300
	tctgatgact ctttccaaaa acaagttaca gcagcaaatc aaacaaattc acaagttatt	360
40	acgcttactg ttaaataatc taatccttac attgcacaaa agattgcaga cgagactgct	420
	aaaatattta gttcagacgc accgaaacta ttgaatgta ctaacgtaa tattctatcc	480
	aaagcaaaag ctcaaacaac accaattagt cctaaaccta aattgtattt agcgatatct	540
45	gttatagtcg gactagtttt aggtttagcc attgctttat tgaagaatt gtttgataac	600
	aaaattaata aagaagaaga tattgaagct ctggggctca cggttcttgg tgtaacaacc	660
50	tatgctcaaa tgagtgattt taataagaat acaataaaa atggcacgca atcgggaact	720
	aagtcaagtc cgctagcga ccatgaagta aatagatcat caaaaaggaa taaaagatag	780
55	<210> 24	
	<211> 696	
	<212> ADN	
	<213> Lactococcus lactis	
60	<400> 24	
	atggctaaaa ataaaagaag catagacaac aatcggtata ttattaccag tgtcaatcct	60
	caatcaccta tttctgaaca atatcgtacg attcgtacga ccattgattt taaaatggcg	120
65	gatcaagggg ttaaaagttt tctagtaaca tcttcagaag cagctgcagg taaatcaacc	180
	gcgagtgcta atatagctgt tgcttttgca caacaaggta aaaaagtact ttaattgat	240
	ggtgatcttc gtaaaccgac tgtaaacatt acttttaaag taaaaatag agtagggtta	300
70	accaatattt taatgcatca atcttcgatt gaagatgcc tacaaggac aagactttct	360

# ES 2 678 699 T3

5  
gaaaatctta caataattac ctctggtcca attccaccta atccatcgga attattagca 420  
tctagtgcaa tgaagaatth gattgactct gtgtccgatt tctttgatgt tgttttgatt 480

10  
gatactccac ctctctctgc agttactgat gctcaaatht tgagtagtta ttagaggagga 540  
gtggttcttg ttgtacgtgc ctatgaaaca aaaaaagaga gtttagcaaa aacaaaaaaa 600  
atgctggaac aagtaatgc aataththta ggagttgtht tgcacggggg agactcttct 660

15  
gactcacctg cgtattacta ctacggagta gagtaa 696

20  
<210> 25  
<211> 687  
<212> ADN  
<213> *Lactococcus lactis*

25  
<400> 25  
atggaaththt ttgaggatgc ctcatcacct gaatcggaag agcctaagtt agtagaatta 60  
aaaaaththt cttatagaga gctaathata aaaagagcaa ttgatathct aggaggatta 120  
gcaggttcag ththththtct tattgctggct gcattgcttht atgtgcctta caaatgagc 180

30  
tcaaaaaaag atcaagggcc aatgttctat aaacaaaaac ggtatggaaa aaacggtaaa 240  
athththata ththgaaath tagaacaatg athththaat cgcagcagta tctagaactt 300  
aatccagatg thaaagctgc thaccatgcc aacggcaata agctagaaaa cgcacccagg 360  
gtaacgaaga ttggctcatt tataagacga cactcaattg atgaactgcc acaaththtc 420  
aatgtthctta aaggggatat ggcatthggtt ggcccaagac caaththgct ththgaaagc 480

40  
aaagaathatg gggagcgcct ctctthctta ctcatgtgta aacctggaath tactggththt 540  
tgacaacac atggtcgaag thaaagthctt ththctcaac gagcagathh agaactctat 600

45  
thctccagth accathgtac caaaaacgat atcaagctthc thgtactcac aathgtacaa 660  
agththaacg gatcggagcgc athththaa 687

50  
<210> 26  
<211> 765  
<212> ADN  
<213> *Lactococcus lactis*

55  
<400> 26  
atgathgata thcathgcca ththththaccg ggtathagatg atggagctaa aactthctgga 60  
gathctctga caatgctgaa atcagcaath gatgaaggga thacaactat cactgctact 120

60  
cctcatcata atctcaath thaatagaa thcactthta ththgaaaa agthaaaggaa 180  
gthcaaaaata thcathgacga acathcaatha ccaathgaag ththththccgg acaaagaggtg 240  
agaathathatg gtgathththt aaaaagaatht ththgaaggaa agthactgac agcagcggggc 300

65  
actthcaagth athaththgat thgaaththcca thcaathcatg thccagctta thgthaaagaa 360  
ctthththata aththcaath ggagggacth caactathth thgthccaccc thgagcghtht 420

70  
agcghaatca thgagaaccc thgathathata ththgaththta thgaacaagg agthactaagth 480

## ES 2 678 699 T3

5	cagataacag cttcaagtgt cactggcat tttggtaaaa aaatacaaaa gctgtcattt	540
	aaaatgatag aaaaccatct tacgcatttt gttgcatcag atgcgcataa tgtgacgtca	600
	cgtgcattta agatgaagga agcgtttgaa attattgaag atagttatgg ttctgatgta	660
10	tcacgaatgt ttcaaaataa tgcagagtca gtgattttaa acgaaagttt ttatcaagaa	720
	aaaccaacaa agatcaaaac aaagaaattt ttaggattat tttaa	765
15	<210> 27 <211> 450 <212> ADN <213> Lactococcus lactis	
20	<400> 27 atgaaaatag cattagtagg ttccagcggg gccatttga cacacctgta tttgttaaaa	60
	aagttttggg aaaacgaaga tagattttgg gtcacatttg ataaagcaga tgcaaatct	120
25	atattgaaag aagaaagatt ttatccttgt tattatccca caaatagaaa tgtaaaaaac	180
	acgataaaaa ataccattct tgcatttaaa atacttagaa aagaaaaacc agatttgatt	240
30	atctcgagtg gtgctgcggt agccgttctt ttttttggg taggtaaact atctcgtgca	300
	aagacagtct atattgaaat atttgaccgg atcgataaac caaccttaac aggaaaatta	360
	gtttatccag ttactgataa gtttatagtt caatgggaag agttaaaaa agtttacct	420
35	aaagcaatta attaggagg aattttctaa	450
	<210> 28 <211> 507 <212> ADN <213> Lactococcus lactis	
40	<400> 28 atgatttttg taacggttgg aactcacgaa caaccattta atcgactcat tcaaaaaatt	60
	gatgaacttg tacgcgatgg tgaatcgaa gacgatgtat tcatgcaaat tgggtactca	120
	acttatgaac ccaaataac taaatgggaa aaggttattg gatatgagac tatggaaaga	180
50	tgtatgaatg aagcgagtac gattattact catggcggac catctaccta tatgcaagta	240
	ttacaactag gtaaaattcc gatagttggt ccacggcaaa tgaatttga tgagcatata	300
55	aatgatcatc aaatttgggt aagtaaacag gttgtgaaaa agggatactc attgattttg	360
	tgcaagatg ttgaagacat tctcgaaaat attattagct caaaatttc agatacctta	420
	caaaaaatg taaatcacia cactgaattc ataaaattat tcagtgtgta aatttaccag	480
60	ctatttataa aaagtgagaa gatatga	507
	<210> 29 <211> 987 <212> ADN <213> Lactococcus lactis	
65	<400> 29 atggttaaat tttctataat tattccagta tataacttag aagattattt atctcgtgt	60
70		

# ES 2 678 699 T3

5	ttagaatctg ttctcaatca agattataat gattttgaga ttatacttat taatgatggt	120
	tcagatgata attcacttaa tattatcgaa gaatttaaaa atcaatattc tagtaaaata	180
10	aaagtaattt ctcaagtgaa tcaaggagta tcatcagcaa gaaataaggg acttcaagaa	240
	gctgaagggg agtatataat ttttatagat ggggatgact acattgatag taatcattta	300
	agtaatattc ttgaatatat aggaaaatca aaaaattcct ttattctaaa tagtctattt	360
15	gtagagaccg gggaaactac ttgggttatt cccaaagcaa gtaagaatta tgattgtagt	420
	ttttatggaa ctcttatgaa tatttttagat aatcatagat atcaaggctt tttgtttaat	480
20	aaaatattta gtaattcagt aataaaaagt aatgaattga agtttaaaga aaatttatat	540
	tatgcggaag atacggagtt tgttattcga taccttttgg agttgcaaaa gagagaatcg	600
	gatttagttg ctaatataat taattctcca acatatcatt atgttcaaat aaaaagtagt	660
25	gctactcacc aatttaatat cagacaattt tctctagtaa attctatgga ggaaattcaa	720
	tgtaatctag aaaaaatgaa atcaataaat aaagaagttt tgtatgtagt acaatcaaat	780
30	ttaattcagt cagtattgaa aatgataaga ttatctagaa taaatggtgt agttaatgaa	840
	catttggaag attcattaga taaaatcgta acaaattcat gggataatat tgaaactatc	900
	tggaatctc aaagaagat ttactctaag gtatttttaa cactaagaat tattcaggaa	960
35	aaagttaagg gtaagaaaat caaatag	987
	<210> 30	
	<211> 867	
40	<212> ADN	
	<213> <i>Lactococcus lactis</i>	
	<400> 30	
45	gtgataatta tacctatctt aatttttatt acccttatag gagcaggggc ttatgcctta	60
	agagattcac ttattcctac tgaacatagc aaaacaaata gttcggatca accgaccaa	120
	acttcggttt ctaacggtta cgtggagcaa aaagtggaag aagctgctgt gggtagtata	180
50	gcactttagt atgacgctgg agtaccagaa tgggttaaag ttccctcaa ggtaaattta	240
	gataaattta ctgatttatc tacgaataat atcactattt atcgaattaa caatccggaa	300
55	gtcttaaaaa cagttaccga tcgtacggat caacggatga aaatgtcaga agttatagct	360
	aagtatccta aactttgat tatgaatgct tccgcttttg atatgcagac aggacaagta	420
	gctggatttc aaattaataa tggaaagttg attcaagact ggagtccagg tacaacgact	480
60	cagtatgctt ttgtattaa caaagatggt tcgtgcaaaa tttatgattc aagtacacct	540
	gcttcaacta ttattaaaaa cggagggcaa caagcctatg attttggtag tgcaattatc	600
65	cgtgatggta aaattcaacc aagtgatggc tcagtagatt ggaagatcca tatttttatt	660
	gcgaatgata aagataataa tctctatgct attttgagtg atacaaatgc aggttatgat	720
	aatataatga aatcagtgtc aaatttgaag ctccaaaata tgttattact tgatagtggt	780
70	ggttcaagtc aactatctgt caatggtaaa acgattggtg ctagtcaaga tgatcgagcc	840

ES 2 678 699 T3

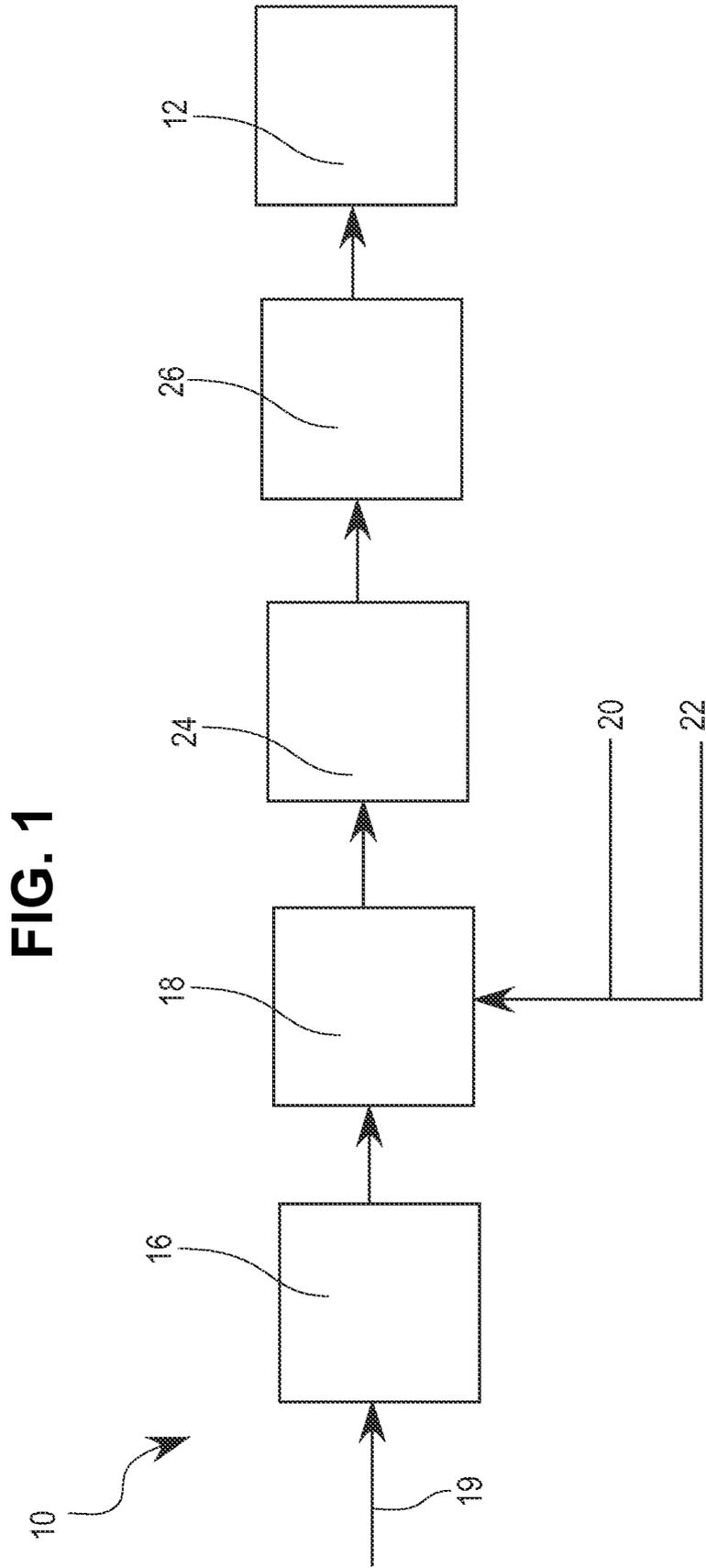
5	gtaccggatt atattgtgat gaaataa	867
	<210> 31	
	<211> 903	
10	<212> ADN	
	<213> Lactococcus lactis	
	<400> 31	
15	atgaatcaaa aaaagaggcg tcattatcgt aagaaaaat acacagtact aaaagttatt	60
	tcaattatth ttgtattagt aattatthct gttgcttcta tagcctacgt agcttataga	120
	aatgttgaat caacctthtc aacatcatat gaaaatthcc ctaaaacaac aagtattgac	180
20	ttaaaaaat ctaaacatt caccacactt atcattgcaa ctggtaaaaa taattctaaa	240
	aattcagctt atgctactgt tttagcttca acgaatgtaa agacaaatca aactactthc	300
25	atgaacthcc cagththtgc gacactgctt aatcaaaaa caatcactga agthttacaat	360
	acgaatggag atgatggaat thtccagatg gthaaagacc tattgaatgc gtccattaac	420
	aaagtaatth agatcgatgt taataaatg ggatcacttg tacaggccac tggthggaatc	480
30	accatgcaaa atccaaaggc attcaatgct gaaggthtatg agthtaaaaa aggaactgth	540
	aatthtaaaa ctgctgatca agthcaaggc tataatgacac aaatthgacga tactgaththg	600
35	gatgctthcaa tcaactcggat tcaaatgthc tcaatggaac tctacgthaa tathtaaaaa	660
	atthctcata thaaaaact thaaagththc aathactatc gagaaatthct ctatgctthth	720
	tcaaacactg thaaaccaa tataagththc aatgatgcta aaacgatcgt tatgagctac	780
40	agtaaggctc taaagaatac cagcaagctc aatctacata caacagatga aatggagct	840
	aagthctgthth ctcaaacaga atthagactca gthcaaaacc thththgaaaa atctctaaaa	900
45	taa	903
	<210> 32	
	<211> 1431	
	<212> ADN	
50	<213> Lactococcus lactis	
	<400> 32	
	thgagthaca caggaataaa agthactaat aaccaatac taataagaaa agthaacagth	60
55	atathththgct thththtcagg aaththgggta ggagctgcaa caagthththth thgagaththct	120
	thtagththth ctgtattagc thggtattata agctcaaat tactagaaaa thgaththgth	180
	ccgtattcag thathththaat actgthththth caaaaththth thgatagthac thggthctcat	240
60	thaacaggga atctgthcagg ththactthth ctcaactcaag thccgatggt ththgththgg	300
	actaththaatc thctgththgaa aaagthtagat aathththctha agththgathth thctthththata	360
65	gthctthththgata ththththctthth thctatctthth gcatththggac gaggthccaat thcaggcaath	420
	aththcgaact thagagathth atcgcaththth ththththactth atcgtaththagg thaaaagathth	480
	atcaaaactg aagaaathth thcgcagththth athaaagaaaa thctthththth aggaaththth	540
70	gthagththththaa thggtaththth ctththactthth ggagthctatc ctthththththaa aththththggga	600

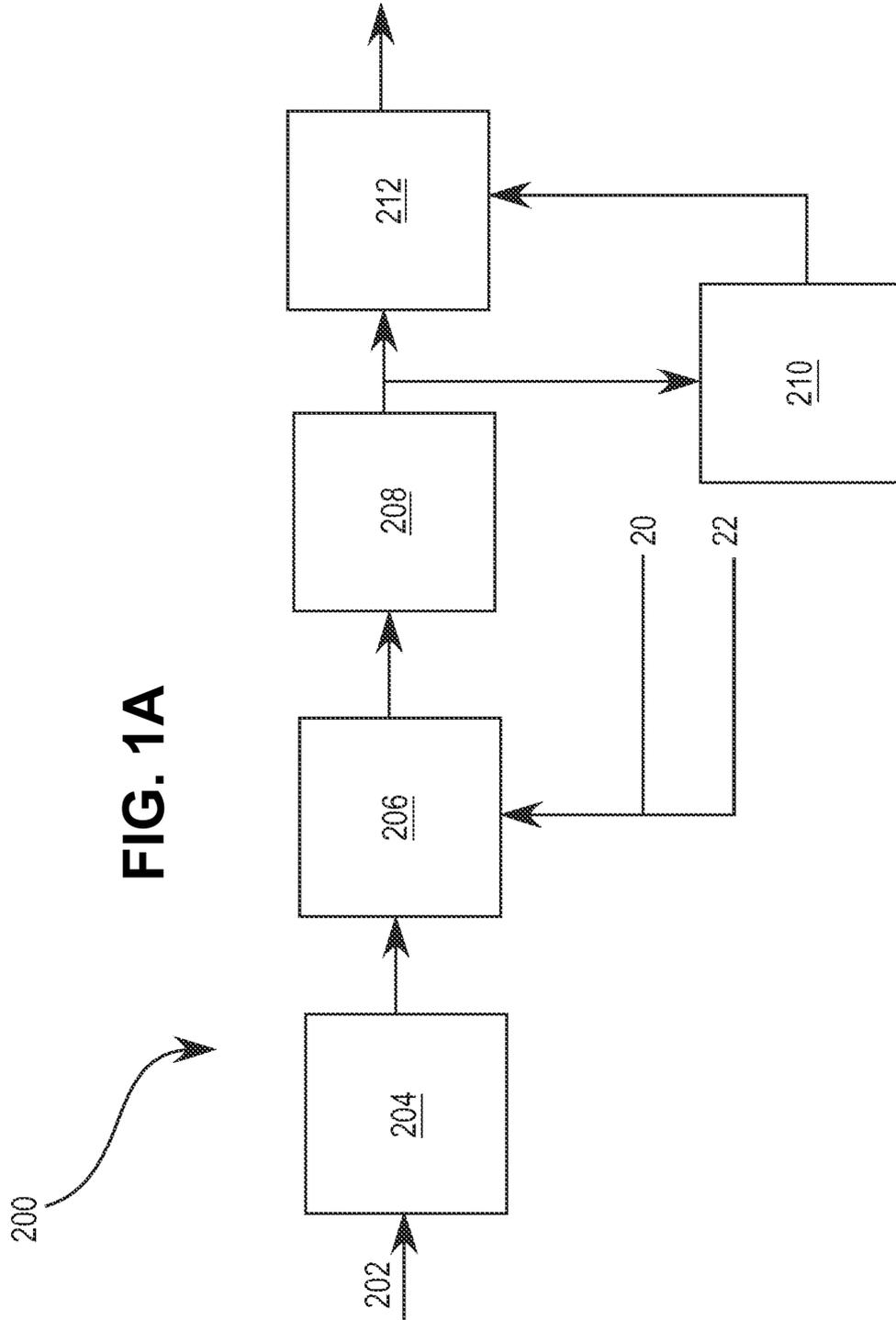
# ES 2 678 699 T3

5	atagatgaaa ttactacgc taaggggta actactttac ttaataatth tgatggcaga	660
	tttggatcag atgtatthgg aatthcogta acacgtatgg gatcaatth tthtgaacca	720
10	ataaatthgg ggtatthaat atthtctatg ctcatthata cctthatth cthtaataacc	780
	caaaaatthaa aatatataaa tthtatataga ctgaththt atgatagthgg aatgthtaact	840
15	tttgggaaag gtgctatgct tctagctata ggggtgatgg ttgcagtht cggacataaa	900
	ttatththtaa aatthctthtc aagaagthaat gaaatgathg tththtagaaa tctththtata	960
	ttgthtaacta ttatthtgtht taththggthga aatthattath tcaaaacttht tggagthgct	1020
20	gtaggthaatc actththtathc aatthcaaggg acaththgata gtataagthca tgcaccaath	1080
	ggtththggat tagththgthgg aggthaacgthc tcahthcagtht ttacagthggg agaatthgath	1140
25	ttactactg gatcagthaac agcctthgtht tcatththgath accaaathagg thgtacaagth	1200
	gctaththgctt taathatgthg atthctactth atgagthaaag aagththgthga aaagthacag	1260
	aagaththcac aatthcaaaaa tagathththt tththtaththc caathgathatt gathththgtht	1320
30	agthataathc aagthaaathc atathacccca caathgthataa cgtthgthtaath gathactththg	1380
	ggagthaththg taggaththgag agacagthgaga aggthaaaaath ataatgththt a	1431
35	<210> 33 <211> 702 <212> ADN <213> Lactococcus lactis	
40	<400> 33 atgathaccaa aagthaaathca ctaththgctgg thcggagthggc aacctththacc agaatctgthc	60
	ctaaathgtht thgaaagththg gagaagththt thgtccagath atgaaathaaa acaathgthct	120
45	gagthaaaaath atgathgthaaa thaaaththca thatacaaaag aagctgthca aaagthaacgth	180
	tathgctththg thcacgthgtht thgcaagthctt gathathctth atagthgagthg gggcaththtath	240
50	ctthgacathg atgththgaaath gathaaaaath thggathgath thgctthgthca thcaagcathath	300
	atgthgthaatgg aaathgctgg thgthgthaaath accgthccaag gaththggagth thataaaaaath	360
	cacaaathag thaaagthcaaa ththagagtht tathgctgthaac thgagththgath thgthacgath	420
55	actthgthgthg cthacacathc thaththgtht aathagaththg gththcaaaaa aathagathath	480
	aaccagthgath thacaagthaat aactathctth ccgacagath atththgthcc athaagthctth	540
60	gaaathagthgath aathagthaat thacagthaaath acathththctath thcatcathath thgathgthgthg	600
	thgthaaaaathg gaaathagthaa atthththctath thaaaaathath aaththcagthc ctgthathgthg	660
	gathactthth atgagthcath aathaacgthag thgaaagthgath ag	702

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de producción de un queso procesado que tiene agentes antimicrobianos naturales, comprendiendo el método:
  - 5 fermentar un medio lácteo líquido con una cepa de *Lactococcus lactis* para producir un componente lácteo cultivado que incluye nisina y exopolisacárido; añadir el componente lácteo cultivado a un queso natural o mezcla de quesos naturales con uno o más emulsionantes para producir un queso procesado que tiene de aproximadamente 8 a 10 aproximadamente 25 por ciento de proteína y de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 por ciento de grasa; en donde el queso procesado incluye una cantidad de nisina, eficaz para evitar la formación de la toxina de *C. botulinum* determinada por el bioensayo de toxina con ratones, en el queso procesado a los niveles de proteína y grasa del mismo durante aproximadamente 9 días a 30 °C (86 °F); y en donde el queso procesado incluye una cantidad de exopolisacárido eficaz para aumentar la fusión del queso procesado y aumentar la firmeza del queso procesado con respecto a un queso procesado sin nisina ni exopolisacárido.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en donde la nisina y el exopolisacárido en el componente lácteo cultivado se obtienen a partir de la fermentación de la misma cepa de *Lactococcus lactis* en el medio lácteo líquido.
3. El método de la reivindicación 1, en donde el componente lácteo cultivado incluye de aproximadamente 1 a 25 aproximadamente 100 ppm de nisina y de aproximadamente 100 a aproximadamente 2.000 ppm del exopolisacárido.
4. El método de la reivindicación 1, en donde el queso procesado incluye de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 por ciento del componente lácteo cultivado.
- 30 5. El método de la reivindicación 1, en donde la cepa de *Lactococcus lactis* es una cepa de *Lactococcus lactis* aislada que tiene todas las características de identificación de la cepa de *Lactococcus lactis* de número ATCC PTA-120552.
- 35 6. El método de la reivindicación 5, en donde la fermentación de la cepa de *Lactococcus lactis* número ATCC PTA-120552 se lleva a cabo en un medio lácteo líquido de 2 veces a 5 veces concentrado a una temperatura de aproximadamente 25 a aproximadamente 35 °C y un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 durante un período de aproximadamente 15 a aproximadamente 48 horas.
- 40 7. El método de la reivindicación 6, en donde el medio lácteo líquido concentrado es una leche concentrada que tiene un total de sólidos de aproximadamente 5 a aproximadamente 36 por ciento, de aproximadamente 1 a aproximadamente 14 por ciento de proteína, y de aproximadamente 0 a aproximadamente 16 por ciento de grasa.
- 45 8. El método de la reivindicación 1, en donde el queso procesado está exento de conservantes artificiales seleccionados del grupo que consiste en ácido sórbico, sorbato potásico, nitritos, y mezclas de los mismos.
9. El método de la reivindicación 1, en donde la nisina es nisina A.
- 50 10. El método de la reivindicación 1, en donde el componente lácteo cultivado incluye nisina A y al menos un gen de un clúster de genes productores de nisina con homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las Id. de sec. n.º 9 a 19 y al menos un gen de un clúster de genes productores de exopolisacárido con homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las Id. de sec. n.º 21 a 33.
- 55 11. El método de la reivindicación 10, en donde el al menos un gen de un clúster de genes productores de nisina y el al menos un gen del clúster de genes productores de exopolisacárido son de la misma cepa de *Lactococcus lactis*.





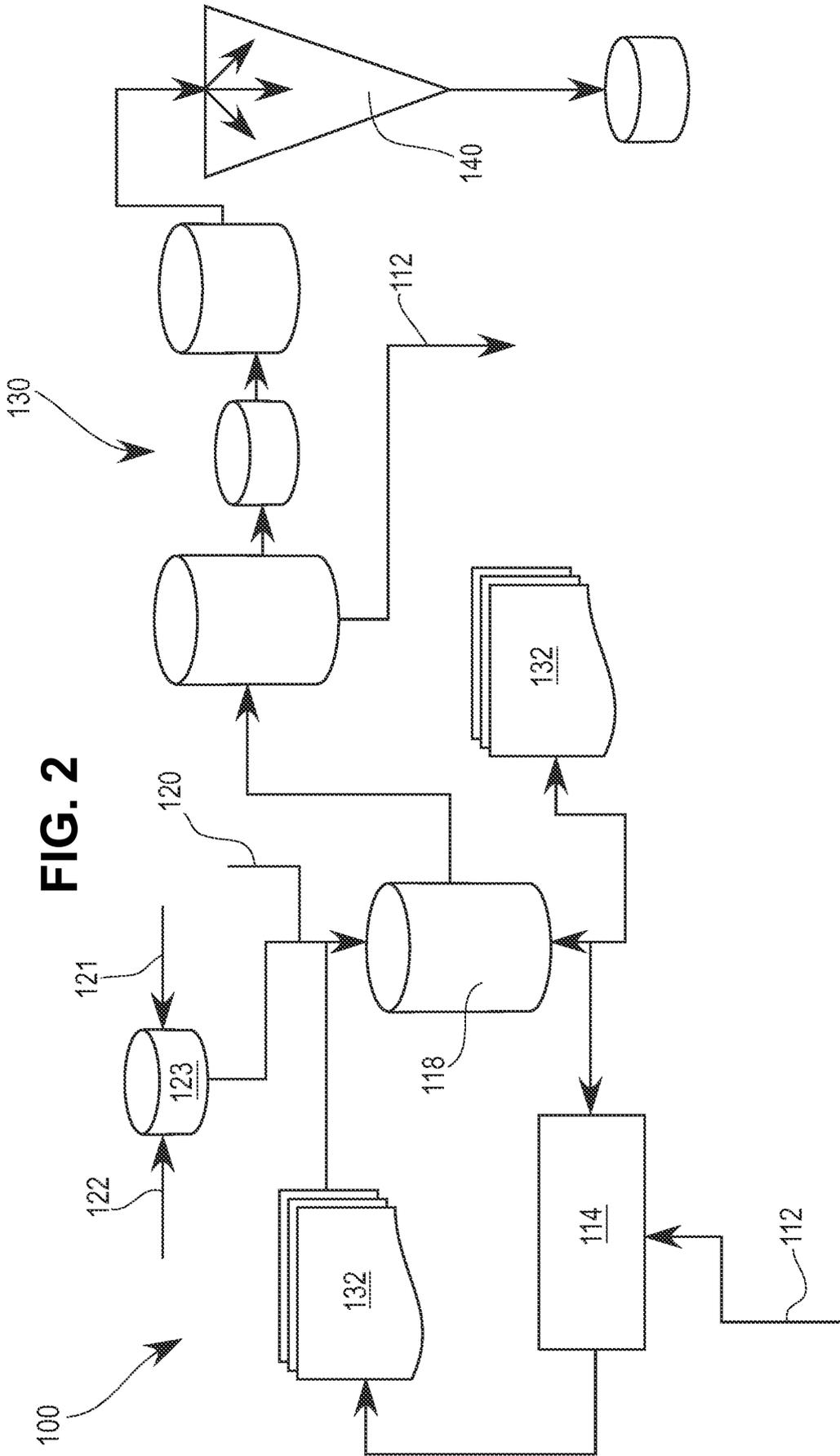
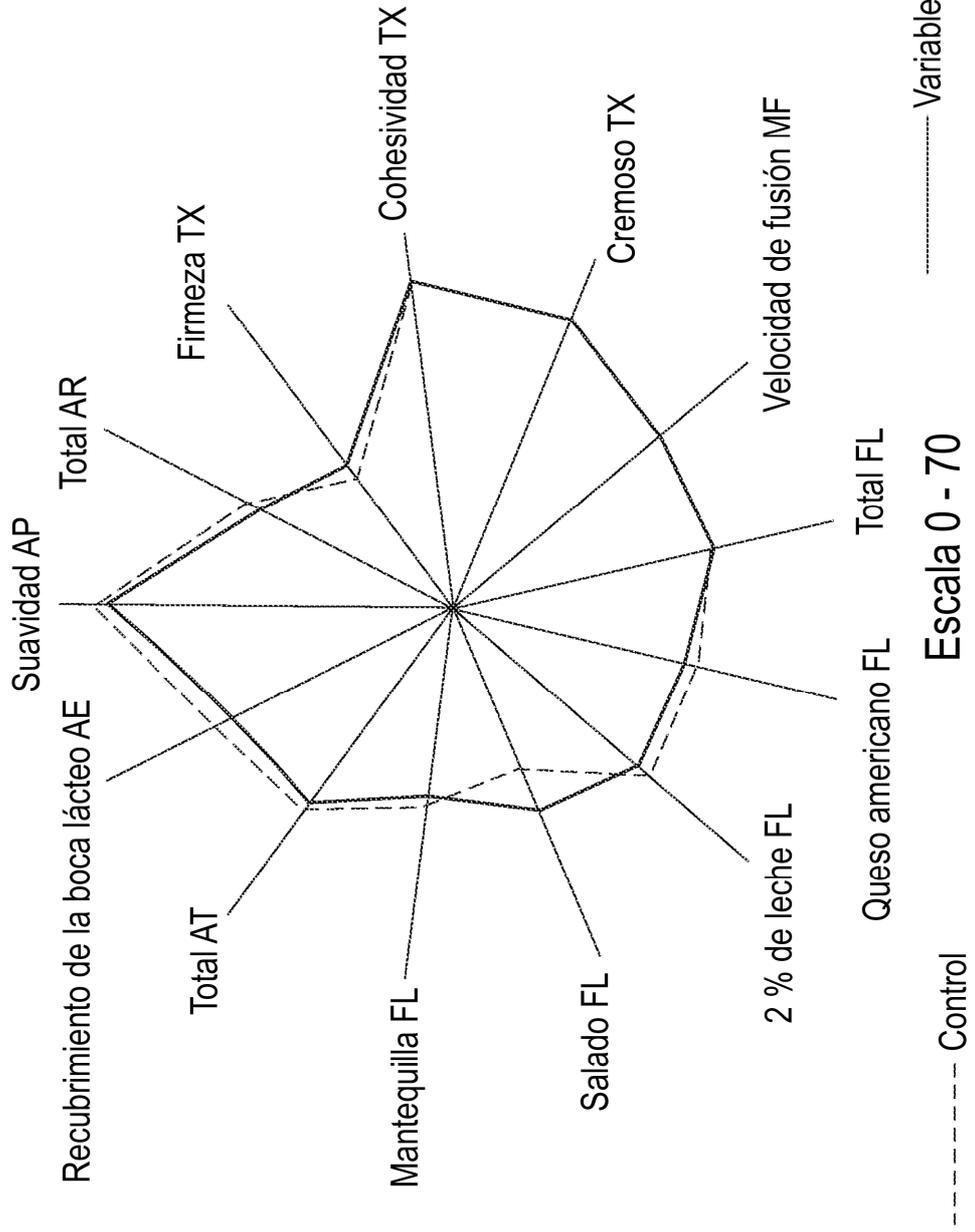
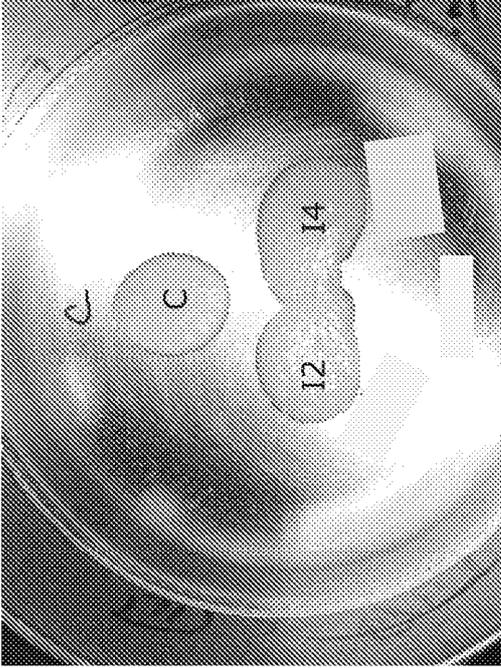


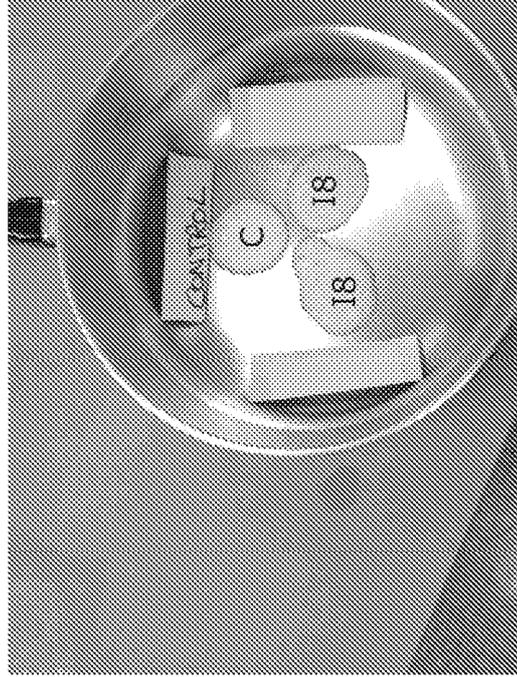
FIG. 2

**FIG. 3**





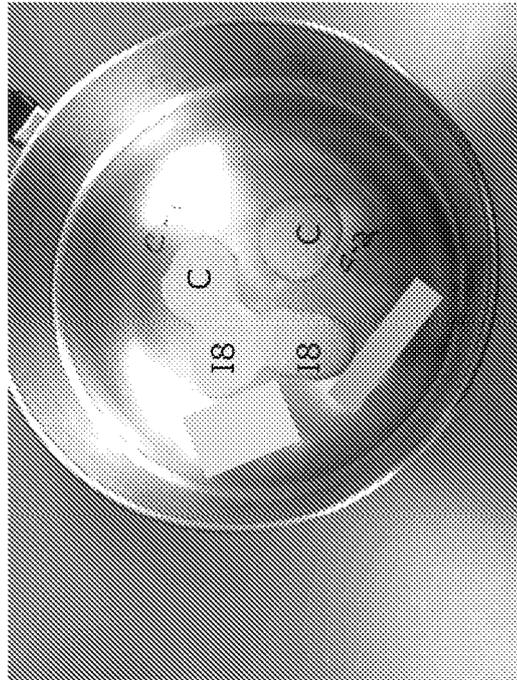
**FIG. 4B**



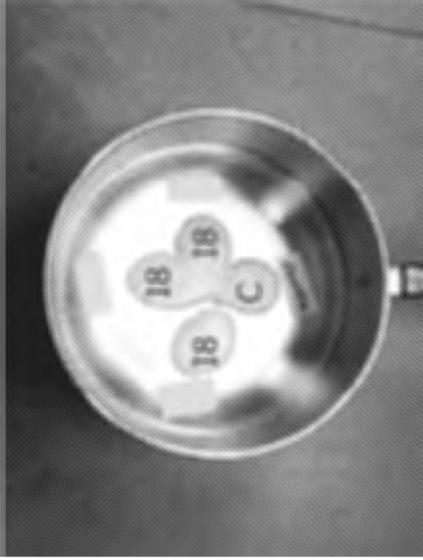
**FIG. 4D**



**FIG. 4A**



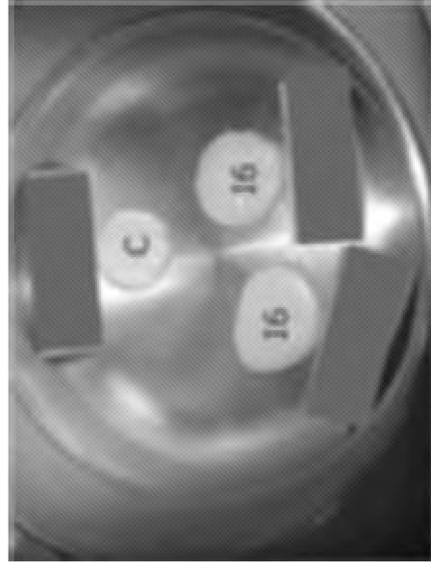
**FIG. 4C**



**FIG. 5B**

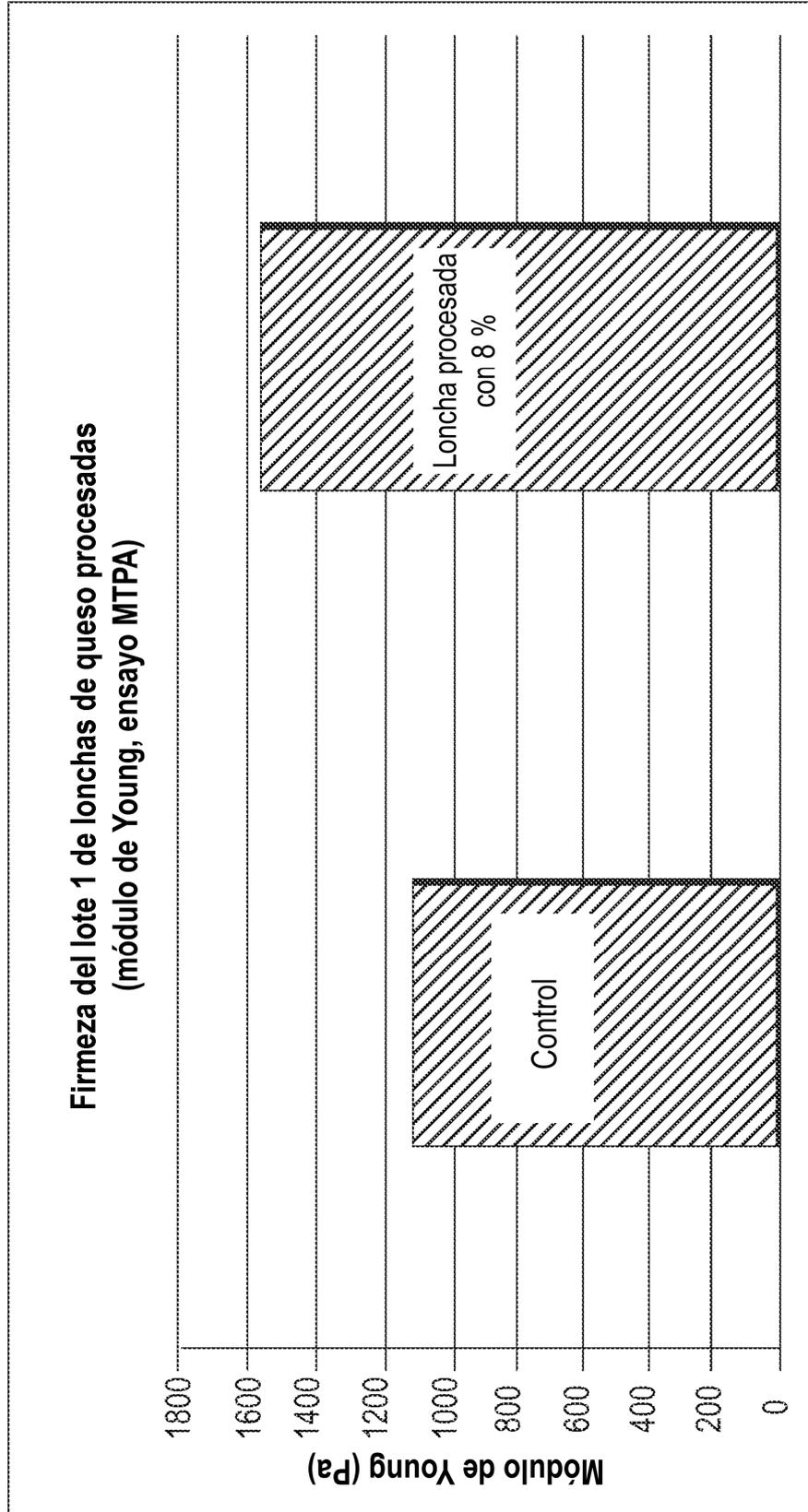


**FIG. 5A**

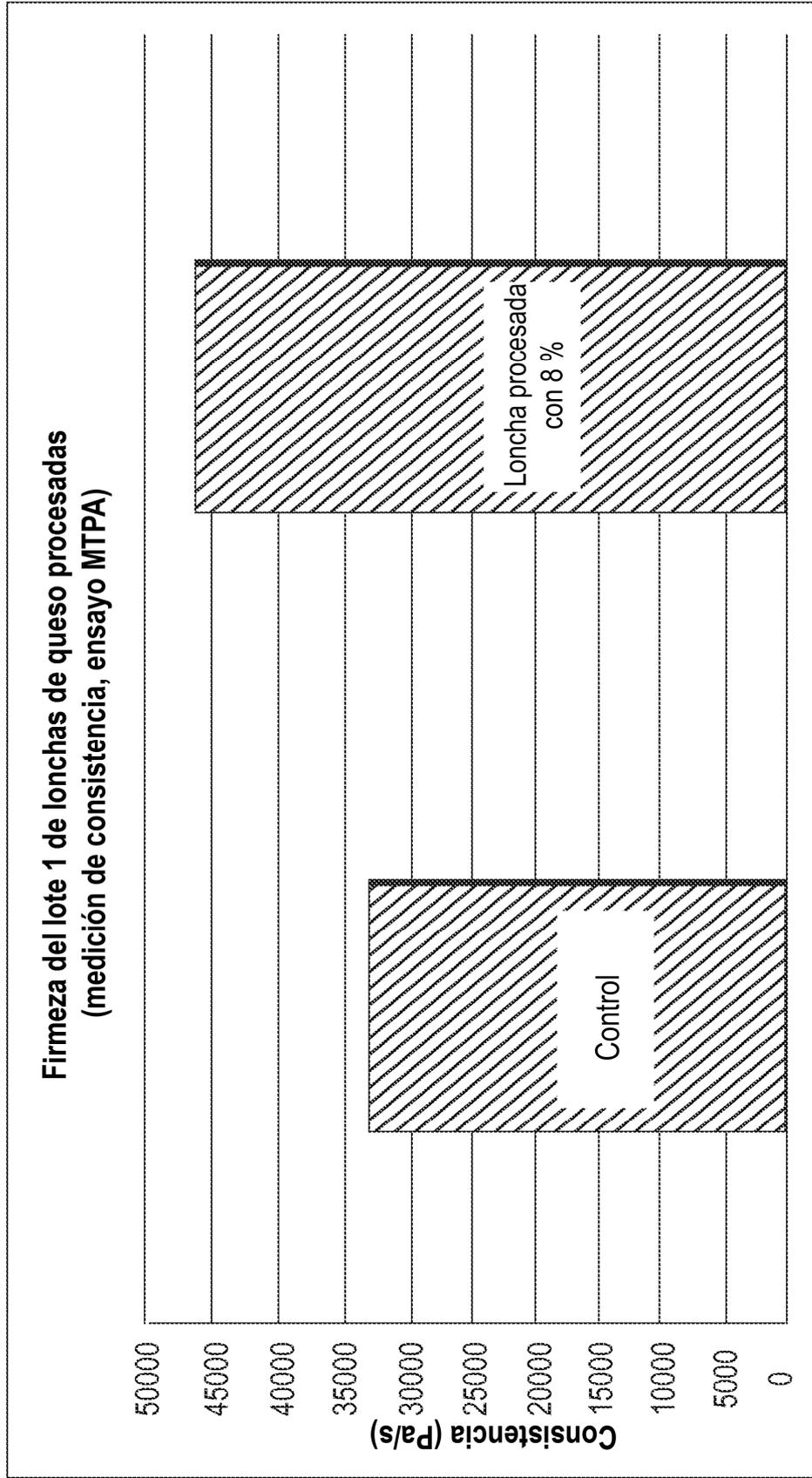


**FIG. 5C**

**FIG. 6**

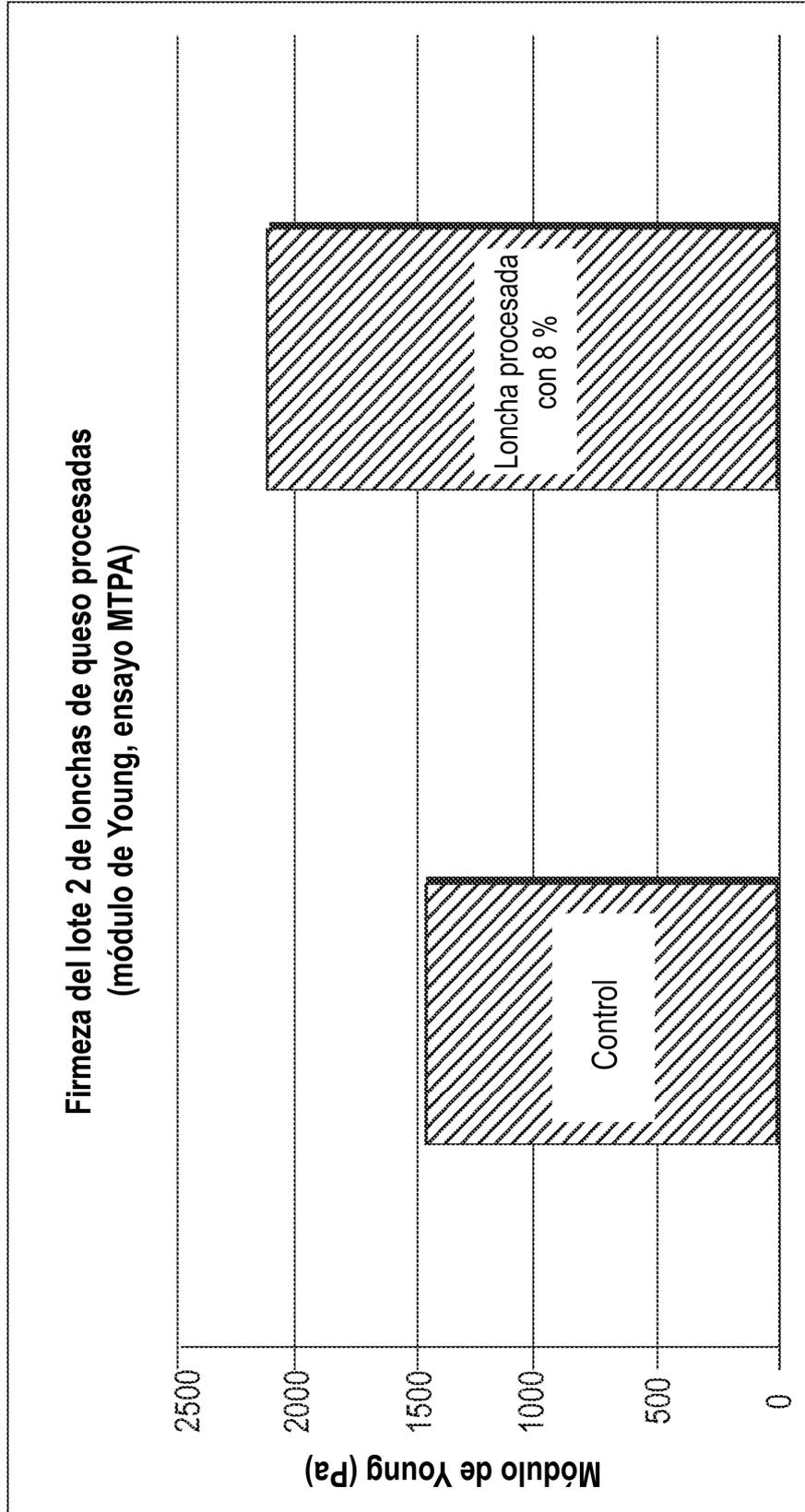


**FIG. 7**

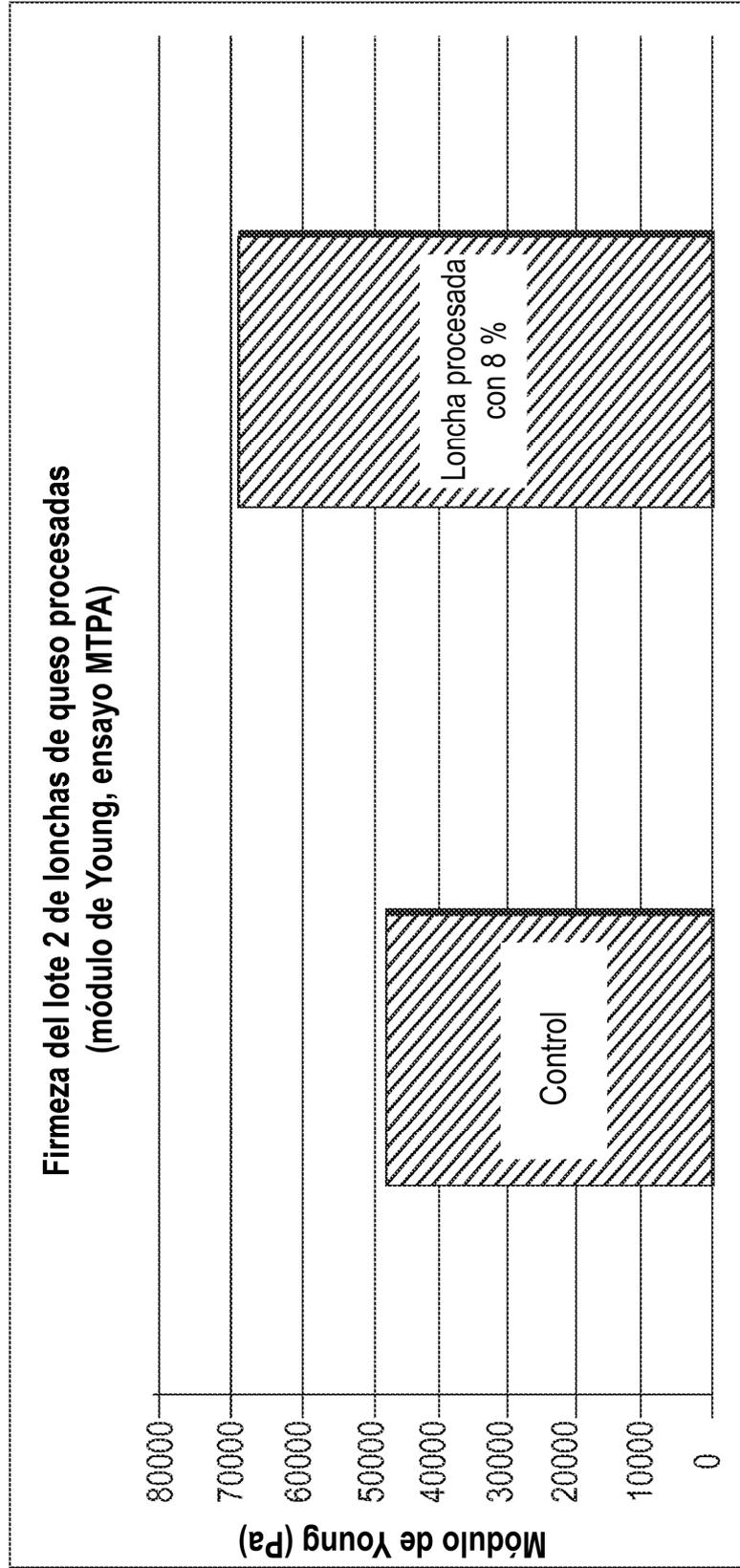


**FIG. 8**

**Firmeza del lote 2 de lonchas de queso procesadas  
(módulo de Young, ensayo MTPA)**



**FIG. 9**



ES 2 678 699 T3

Gen/ posición nt	329			ATCC 11454			NB1		
	Posición	Referencia	Cambio	Posición	Referencia	Cambio	Posición	Referencia	Cambio
acmD	Ningún cambio			Ningún cambio			409	T	C
180-610							447	G	A
							600	T	A
gapB	Ningún cambio			433	A	G	Ningún cambio		
70-510									
pdhD	Ningún cambio			823	T	A	619	C	T
515-910							634	G	A
							823	T	A
pepC	Ningún cambio			Ningún cambio			306	C	T
250-680							349	T	G
							370	A	G
							613	A	G
thiE	Ningún cambio			Ningún cambio			256	C	T
110-535							262	C	T
							293	C	G
							390	A	G
							487	T	A
yjiD	Ningún cambio			Ningún cambio			1214	T	C
1165-1590							1397	C	T
							1488	C	T
							1534	C	T
							1538	C	A
							1554	A	G
							1566	C	T
							1569	C	A
							1573	G	A
yyaL	Ningún cambio			544	T	A	578	T	C
400-830				578	T	C			
Tipo nisina	A			A			Z		

- Los cambios específicos en los nucleótidos se enumeran para cada uno de los genes examinados

**FIG. 10**

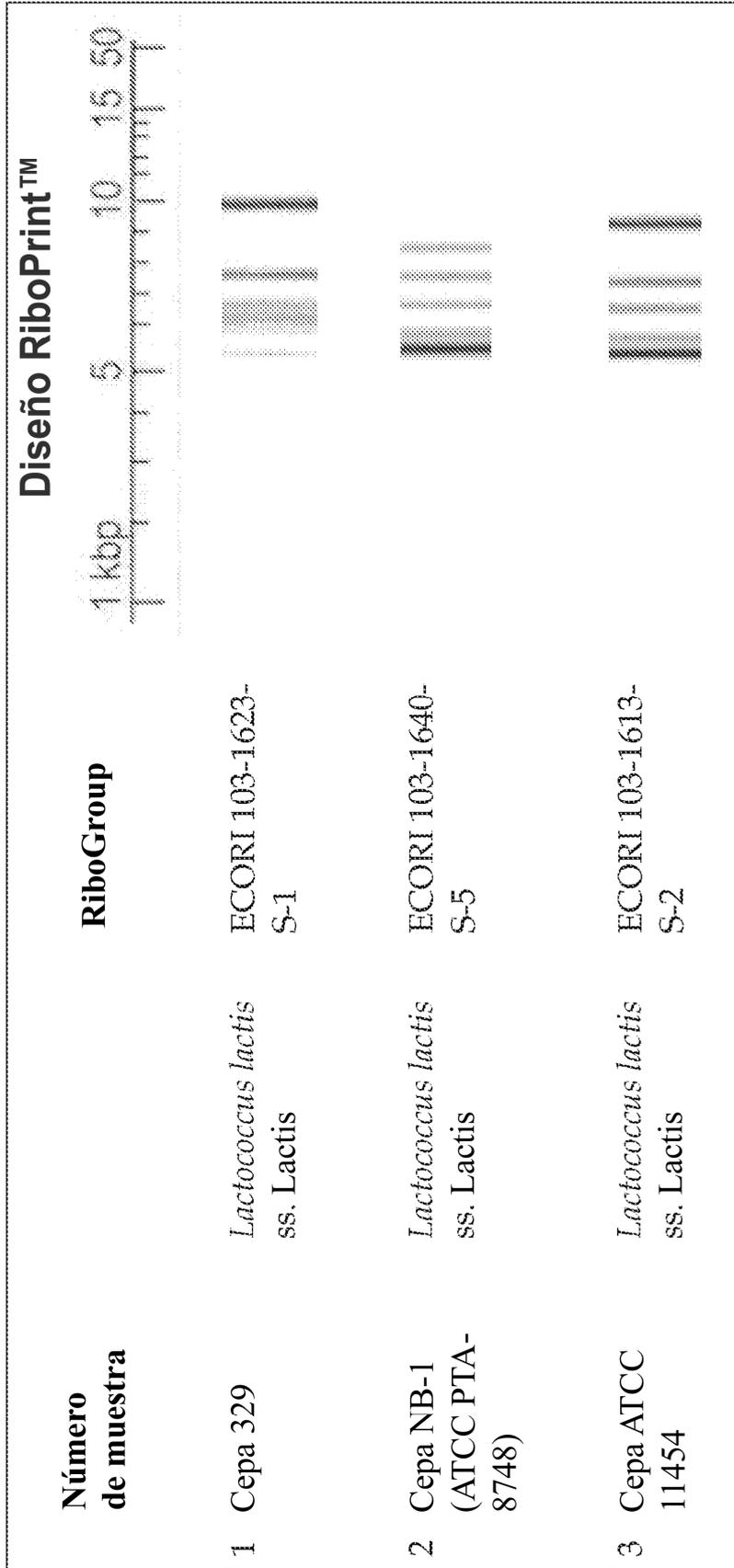
Fago		Huésped		
Nombre	Número	329	NB-1	ATCC 11454
2T1	61	R	S	R
VT6	136	R	R	R
2-3	151	R	S	R
PP	211	R	R	R
EL-2	213	R	R	R
N046	219	R	R	R
N067	220	R	R	R
NC	221	R	R	R
SP	222	R	R	R

R=resistente  
S=sensible

Cultivo	Tipo de fago
329	1
NB-1 (ATCC PTA-8748)	2
ATCC 11454	1

1=no se han identificado fagos  
2=se han identificado fagos diseño núm. 1

**FIG. 11**



Cepa	RiboGroup	RiboTipo
329	EcoRI 103-1623-S-1	3
NB-1	EcoRI 103-1640-S-5	5
ATCC 11454	EcoRI 103-1613-S-2	2

**FIG. 12**

Cultivo Kraft 329	L. lactis subsp. Lactis CV56	L. lactis subsp. Lactis IO-1	L. lactis subsp. Lactis KF147	L. lactis subsp. Cremois A76	Anotación Nombre del gen
1	0	1	1	1	Regulador transcripcional familia XRE
1	0	0	1	1	Esterasa EpsX
1	0	0	1	0	Modulador transmembrana de tirosina-proteína quinasa
1	0	0	1	1	Tirosina-Proteína quinasa
1	0	0	0	0	Undecaprenil-fosfato galactosa
1	0	0	1	1	Fosfatasa de proteína-tirosina dependiente de manganeso
1	0	0	0	0	Proteína de biosíntesis de polisacárido
1	0	0	0	0	Glicosiltransferasa cpsg
1	0	0	0	0	Proteína 2 de familia de glicosiltransferasa
1	0	1	0	1	EpsL de transferasa de azúcar
1	0	0	0	0	Proteína de función desconocida
1	0	0	0	0	Proteína de función desconocida (extremo trasero del gen similar al operón del tipo VII de <i>S. Thermophilus eps</i> )
1	0	0	0	0	Proteína de biosíntesis de polisacárido cpsm (porción similar al gen de <i>S. afgalactiae</i> en clúster de cps)
<hr/>					
1	1	1	1	0	Precursora de nisina NisA
1	1	1	0	0	Proteína de biosíntesis de nisina NisB
1	1	1	1	0	Proteína de unión a ATP de transporte de nisina
1	1	1	0	0	Proteína de biosíntesis de nisina NisC
1	1	1	1	0	Proteína de inmunidad de nisina NisI
1	1	1	0	1	Proteasa de serina de procesamiento de péptido líder de nisina nisP
1	1	1	1	0	Sistema de dos componentes de biosíntesis de nisina, regulador de respuesta NisR
1	1	1	1	0	Sistema de dos componentes de biosíntesis de nisina, sensor histidina quinasa NisK
1	1	1	1	0	Proteína transportadora de nisina NisF
1	1	1	1	0	Proteína transportadora de nisina NisE
1	1	1	1	0	Proteína transportadora de nisina NisG
0	0	0	0	0	Proteína de resistencia a nisina

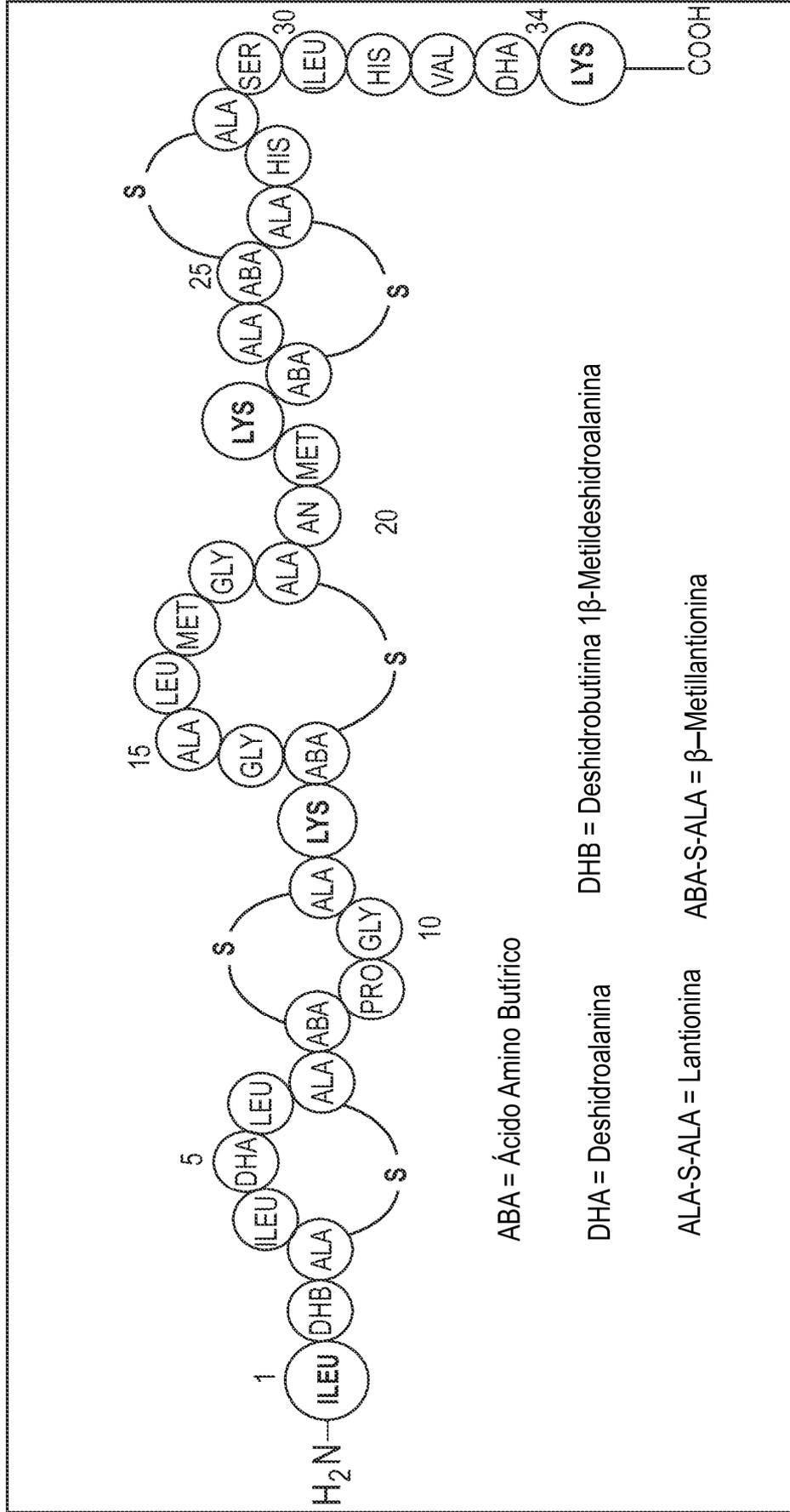
**Clúster de EPS**

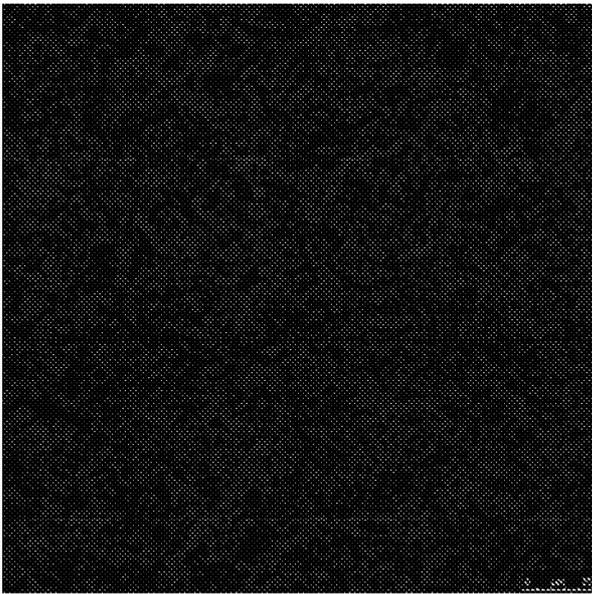
**Clúster de nisina**

CV56 es un productor de nisina  
 IO-1 es un productor de nisina  
 KF147 no es un productor de nisina, pero es resistente a nisina.  
 A76 no es un productor de nisina

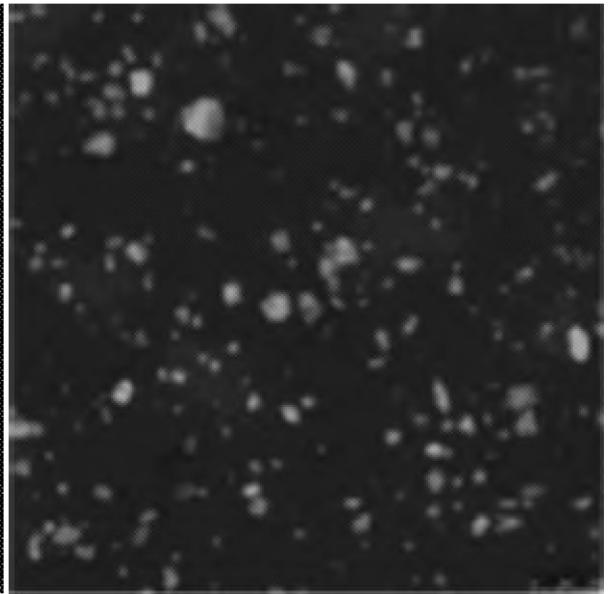
**FIG. 13**

**FIG. 14**





**FIG. 15A**



**FIG. 15B**