

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 996**

51 Int. Cl.:

A23C 19/06 (2006.01)

C12R 1/46 (2006.01)

A23C 19/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2014 PCT/US2014/069278**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15089029**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2014 E 14821401 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3079480**

54 Título: **Queso procesado con componentes antibacterianos y antimicóticos naturales y método de fabricación**

30 Prioridad:

10.12.2013 US 201361914246 P

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

23.12.2019

73 Titular/es:

**KRAFT FOODS GROUP BRANDS LLC (100.0%)
Three Lakes Drive
Northfield, IL 60093, US**

72 Inventor/es:

**MARCUS-JOHNSON, CHRISTINE D.;
CHINWALLA, AMMAR N. y
REEVE, JON L.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 735 996 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 antibacterianos y antimicrobicos naturales y método de fabricación

Campo

5 La presente solicitud se refiere generalmente a composiciones de queso procesado y a métodos de fabricación, y más particularmente a composiciones de queso procesado que contienen componentes antibacterianos y antimicrobicos naturales.

Antecedentes

10 El queso procesado, ampliamente disponible en formas de lonchas y barra, se ha convertido en uno de los productos de queso de venta más populares. Los productos de queso procesado son particularmente populares con los niños. El queso procesado se prepara convencionalmente calentando, triturando y/o mezclando una o más variedades de quesos naturales que contienen grasa de la leche tales como, por ejemplo, queso Cheddar, queso Colby, queso suizo, queso Brick, queso Muenster, queso de pasta hilada, cuajada de lavado y queso de cuajada granular, por sugerir algunos tipos. El queso resultante se mezcla entonces con otros productos lácteos, tales como leche desnatada en polvo y sólidos del suero lácteo, y sales emulsionantes, tales como fosfato de sodio, a temperaturas
15 que son suficientemente elevadas para pasteurizar el queso y para producir un material de queso fluido, bombeable, homogéneo al que se le puede dar forma de hojas, lonchas, u otras formas deseadas.

20 Se desea frecuentemente prolongar la estabilidad en almacén de los alimentos, tales como el queso procesado, y/o aumentar la estabilidad microbiológica de dichos alimentos. Aumentando la cantidad de tiempo que un alimento es estable, los procesadores pueden mitigar las pérdidas de inventario debido a productos alimenticios echados a perder. Se han usado los métodos anteriores, tales como el uso de envases, conservantes, y/o parámetros de almacenamiento específicos (por ejemplo, refrigeración), para evitar el deterioro.

25 En particular, *Listeria monocytogenes* y *C. botulinum* pueden, en algunos casos, ser una preocupación con alimentos como la leche cruda, quesos (particularmente las variedades de maduración suave), helados, verduras crudas, salchichas de carne cruda fermentada, aves de corral crudas y cocinadas, carnes crudas (de todo tipo) y pescado crudo y ahumado. La capacidad de estos patógenos para crecer, en algunos casos, a temperaturas de tan solo 3 °C permite la multiplicación en los alimentos refrigerados.

30 Además, mientras que se desea proporcionar estabilidad en almacén mejorada a los alimentos, tales como el queso procesado, también ha habido un mayor deseo de proporcionar alimentos que contengan una elevada cantidad de ingredientes naturales. A este respecto, se puede desear proporcionar alimentos que incluyen solo ingredientes naturales o retirar de otro modo los materiales artificiales. Por ejemplo, el queso procesado utiliza a veces conservantes tales como ácido sórbico para mejorar la seguridad y estabilidad en almacén del alimento. Se puede desear incorporar conservantes y/o antimicrobianos naturales, mientras que se mantienen y/o mejoran las características del queso procesado.

35 El documento de patente US 2011053832 se refiere a un antimicrobiano natural para alimentos, que comprende un componente de nisina en el intervalo de 2-40 ppm de nisina; y un ácido orgánico no disociado/sal. El documento de patente US 4584199 se refiere a un producto de queso de proceso pasteurizado que contiene al menos 54 % en peso de humedad que contiene una cantidad de nisina o un cultivo productor de nisina suficiente para inhibir el crecimiento de esporas botulínicas. El documento de patente US 5895680 se refiere a un producto alimenticio que tiene un pH de aproximadamente 2,0 a 7,0 y que contiene una cantidad suficiente de natamicina en combinación con
40 nisina para prevenir el deterioro microbiano, en donde la natamicina está presente en una cantidad de al menos aproximadamente 20 a 500 ppm y dicha nisina está presente en una cantidad de aproximadamente 1 a 50 ppm basadas en el contenido de agua del producto alimenticio.

Sumario

45 En el presente documento se proporcionan quesos procesados que incluyen componentes antibacterianos y antimicrobicos naturales. El antibacteriano natural es nisina. En algunos enfoques, la nisina incluye nisina A. El antimicrobico natural es natamicina. Se ha encontrado inesperadamente que un queso procesado que incluye nisina y natamicina tiene una estabilidad en almacén sorprendentemente larga debido a la inhibición del crecimiento de moho y microorganismos Gram-positivos a pesar de la inclusión de bajas cantidades de nisina y natamicina. Es particularmente sorprendente que estas bajas cantidades de nisina y natamicina sean eficaces para prolongar la
50 estabilidad en almacén de los productos de queso procesado debido a que se conoce que la natamicina es propensa a la degradación.

55 En algunos enfoques, el queso procesado está libre de conservantes artificiales seleccionados del grupo que consiste en ácido sórbico, sorbato de potasio, nitritos, y sus combinaciones. Como se usa en el presente documento, las expresiones "no contiene", "está libre de" o "sustancialmente libre de" significan menos de aproximadamente 0,5 por ciento, en otros enfoques, menos de aproximadamente 0,1 por ciento y, en algunos casos, menos de aproximadamente 0,05 por ciento y en otros casos, nada.

El queso procesado incluye una cantidad de antibacteriano natural eficaz para prevenir la formación de toxinas de *Clostridium botulinum* durante al menos aproximadamente 9 días cuando el queso procesado se almacena a aproximadamente 30 °C (86 °F). El queso procesado también puede incluir antibacteriano natural en una cantidad eficaz para prevenir más de 1 log de crecimiento de *Listeria monocytogenes* durante al menos aproximadamente un mes, en otro aspecto al menos aproximadamente dos meses, en otro aspecto al menos aproximadamente tres meses, en otro aspecto al menos aproximadamente cuatro meses, en otro aspecto al menos aproximadamente cinco meses, en otro aspecto al menos aproximadamente seis meses, y en todavía otro aspecto al menos aproximadamente 7 meses, durante el almacenamiento a 7,2 °C (45 °F). En algunos aspectos, la nisina es nisina A.

La cantidad de natamicina añadida durante la fabricación del queso procesado se debe seleccionar teniendo en cuenta que una porción de la natamicina será degradada durante el proceso de cocción. Por tanto, la cantidad de natamicina inicialmente añadida al queso procesado puede ser significativamente superior a la que queda en el producto en, por ejemplo, un mes, dos meses, o tres meses de almacenamiento. Generalmente, se desea seleccionar condiciones de proceso que optimicen la retención de natamicina en el producto. También se encontró que se deseaba seleccionar una concentración de natamicina inicial que fuera eficaz para proporcionar un producto de queso procesado que, después de la etapa de cocción en el proceso para producir el queso procesado, hubiera retenido 0,5 a 6 ppm de natamicina, en otros enfoques aproximadamente 2 a 6 ppm de natamicina, en otros enfoques aproximadamente 2 a aproximadamente 5 ppm de natamicina, y en otros enfoques aproximadamente 2 a aproximadamente 4 ppm de natamicina, como se detecta por HPLC. En un aspecto, la cantidad de natamicina se puede medir en el plazo de 72 horas desde la finalización de la etapa de cocción, tal como en el plazo de 72 horas desde el envasado del producto. Como esta es la cantidad que queda después de la etapa de cocción, puede ser necesario incluir inicialmente una mayor cantidad de natamicina tal que permanezcan las cantidades descritas después de que al menos una porción de la natamicina se degrade durante la producción del queso procesado.

En algunos enfoques, el queso procesado incluye una cantidad de antimicótico natural eficaz para prevenir el crecimiento de mohos durante al menos aproximadamente tres meses, en otro aspecto al menos aproximadamente cuatro meses, en otro aspecto al menos aproximadamente cinco meses, en otro aspecto al menos aproximadamente seis meses, y en otro aspecto más al menos aproximadamente siete meses, cuando el queso procesado se almacena a aproximadamente 1 a aproximadamente 10 °C. La eficacia de la natamicina en el producto de queso procesado se puede determinar realizando un estudio de exposición a mohos, donde muestras del queso procesado se inoculan con una cantidad conocida de esporas de moho, tales como 90 ufc /g o 500 ufc/g, y se inspeccionan las muestras para el crecimiento visible de mohos durante el almacenamiento a 4,4 a 7,2 °C (40 a 45 °F).

La nisina del queso procesado se incluye en el queso procesado en forma de un componente lácteo cultivado, que se proporciona en 1 a 20 por ciento en el queso procesado. La nisina en el componente lácteo cultivado también se puede obtener a partir de una fermentación de una única cepa bacteriana en un medio lácteo líquido. La cepa bacteriana puede ser cualquier cepa bacteriana productora de nisina, tal como cepas productoras de nisina de *Lactococcus lactis*. Una cepa de *Lactococcus lactis* preferida para su uso en el presente documento tiene todas las características identificadoras de la cepa de *Lactococcus lactis* de ATCC PTA-120552.

El queso procesado incluye 10 a 90 por ciento de queso natural o una mezcla de quesos naturales; uno o más emulsionantes opcionales; 8 a 25 por ciento de proteína; y 10 a 30 por ciento de grasa.

También se proporciona un método de producción de un queso procesado que incluye componentes antibacterianos y antimicóticos 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 añadir natamicina y 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 8 a 25 por ciento de proteína y 10 a 20 por ciento de grasa. El queso procesado incluye 0,5 a 6 ppm de natamicina y una cantidad de nisina eficaz para prevenir la formación de toxinas de *C. botulinum* determinada por el bioensayo de toxinas con ratones en el queso procesado en los niveles de proteína y grasa del mismo durante aproximadamente 9 días a 30 °C (86 °F), en donde el queso procesado incluye 1 a 100 ppm de nisina.

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

En otros enfoques, el método es eficaz de manera que el queso procesado esté libre de conservantes artificiales seleccionados del grupo que consiste en ácido sórbico, sorbato de potasio, nitritos, y sus mezclas.

En algunos enfoques, el componente lácteo cultivado del método incluye nisina A y una cepa bacteriana que tiene al menos un gen de un grupo de genes productores de nisina con homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO 9 a 19.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra la producción de un componente lácteo cultivado a modo de ejemplo producido a partir de un líquido lácteo concentrado;

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

- 5 la FIG. 2 es un diagrama de flujo de proceso que ilustra una segunda forma de producción de un componente lácteo cultivado a modo de ejemplo producido a partir de ingredientes lácteos en polvo;

la FIG. 3 es una tabla que muestra los resultados de un estudio de exposición a mohos de queso procesado que incluye nisina y natamicina;

- 10 la FIG. 4 es un gráfico que muestra los resultados del análisis de tipificación de fagos de cepas productoras de nisina;

la FIG. 5 incluye resultados de los análisis Riboprinter de diversas cepas de *Lactococcus lactis*;

la FIG. 6 es un gráfico que compara los genes relacionados con EPS de diversas bacterias de ácido láctico; y

la FIG. 7 muestra la secuencia de aminoácidos de nisina A.

Descripción detallada

- 15 La presente invención, que se define por las reivindicaciones, generalmente se refiere a queso procesado que incluye, entre otros aspectos, componentes antibacterianos y antimicóticos naturales. El queso procesado proporcionado en el presente documento que incluye tanto antibacteriano (nisina) como antimicótico natural (un compuesto de polieno, natamicina) tiene propiedades antimicrobianas significativamente mejoradas en comparación con queso procesado con la misma formulación, excepto conservantes artificiales y/u otros tipos de antimicrobianos naturales previos. Se descubrió inesperadamente que la combinación de componentes antibacterianos y antimicóticos naturales en el queso procesado descrito en el presente documento fue eficaz en inhibir microorganismos Gram-positivos tales como *C. botulinum* y el crecimiento de mohos a niveles sorprendentemente bajos de ambos componentes. En un aspecto, los componentes antibacterianos naturales y antimicóticos naturales se incorporan en el queso procesado durante producción del queso y no se incluyen como una administración tópica.

- 25 Como se trata más adelante, antimicrobianos previos tendieron a ser menos eficaces en el contexto de un queso procesado con altos niveles de proteína y grasa debido a que se creía que los niveles de proteína y grasa en el queso procesado en combinación con niveles de humedad más bajos proporcionaban una matriz de queso que tendía a proteger y/o blindar diversos patógenos de ser inhibidos por las formas comerciales de nisina y otros antimicrobianos naturales. Se ha encontrado inesperadamente que un queso procesado que incluye nisina y natamicina tiene una estabilidad en almacén sorprendentemente larga debido a la inhibición del crecimiento de moho y microorganismos Gram-positivos a pesar de la inclusión de bajas cantidades de la nisina y natamicina. Es particularmente sorprendente que estas bajas cantidades de nisina y natamicina sean eficaces para prolongar la estabilidad en almacén de los productos de queso procesado debido a que se conoce que la natamicina es propensa a la degradación.

- 35 Como se usa en el presente documento, los términos "antibacteriano natural" y "antimicótico natural" se refieren a componentes con actividades antibacterianas y antimicóticas, respectivamente, que se producen por un organismo, tal como por un cultivo bacteriano durante un proceso de fermentación. Se pueden incluir uno o más componentes antibacterianos y antimicóticos naturales diferentes en el queso procesado. En una forma, el queso procesado contiene una cantidad suficiente de componentes antibacterianos y antimicóticos naturales de forma que el queso procesado no contenga o esté libre de conservantes artificiales, tales como ácido sórbico, sorbato de potasio y similares. Como se usa en el presente documento, las expresiones "no contiene", "está libre de" o "sustancialmente libre de" significan menos de aproximadamente 0,5 por ciento, en otros enfoques, menos de aproximadamente 0,1 por ciento y, en algunos casos, menos de aproximadamente 0,05 por ciento y en otros casos, nada.

- 45 El queso procesado incluye una cantidad de antibacteriano natural eficaz para prevenir la formación de toxinas de *Clostridium botulinum* durante al menos aproximadamente 9 días cuando el queso procesado se almacena a 30 °C (86 °F). El queso procesado también puede incluir antibacteriano natural en una cantidad eficaz para prevenir más de 1 log de crecimiento de *Listeria monocytogenes* durante al menos aproximadamente un mes, en otro aspecto al menos aproximadamente dos meses, en otro aspecto al menos aproximadamente tres meses, en otro aspecto al menos aproximadamente cuatro meses, en otro aspecto al menos aproximadamente cinco meses, en otro aspecto al menos aproximadamente seis meses, y en otro aspecto más al menos aproximadamente siete meses, durante el almacenamiento a aproximadamente 7,2 °C (45 °F).

Los antimicóticos naturales incluyen antimicóticos de polieno, y es natamicina, y el antibacteriano natural es nisina.

Los quesos procesados en el presente documento incluyen 1 a 100 ppm de nisina, en otros enfoques aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 ppm de nisina, en otros enfoques aproximadamente 1 a

aproximadamente 15 ppm de nisina, en otros enfoques aproximadamente 1 a aproximadamente 10 ppm de nisina, en otros enfoques aproximadamente 1 a aproximadamente 5 ppm de nisina, en otros enfoques aproximadamente 3 a aproximadamente 5 ppm de nisina, y en aún otros enfoques aproximadamente 3 a aproximadamente 4 ppm de nisina. En aún otros enfoques, la nisina incluye nisina A.

- 5 Los quesos procesados descritos en el presente documento incluyen 0,5 a 6 ppm de antimicótico natural, en otros enfoques aproximadamente 2 a aproximadamente 4 ppm de antimicótico natural, y en aún otros enfoques aproximadamente 2 a aproximadamente 4 ppm de antimicótico natural. El antimicótico natural es natamicina.

La cantidad de natamicina añadida durante la fabricación del queso procesado se debe seleccionar teniendo en cuenta que una porción de la natamicina será degradada durante el proceso de cocción. Por tanto, la cantidad de natamicina inicialmente añadida al queso procesado puede ser significativamente superior a la que queda en el producto en, por ejemplo, un mes, dos meses, o tres meses de almacenamiento. Generalmente, se desea seleccionar condiciones de proceso que optimicen la retención de natamicina en el producto. También se encontró que se deseaba seleccionar una concentración de natamicina inicial que fuera eficaz para proporcionar un producto de queso procesado que, después de la etapa de cocción en el proceso para producir el queso procesado, hubiera retenido 0,5 a 6 ppm de natamicina, en otros enfoques aproximadamente 2 a 6 ppm de natamicina, en otros enfoques aproximadamente 2 a aproximadamente 5 ppm de natamicina, y en otros enfoques aproximadamente 2 a aproximadamente 4 ppm de natamicina, como se detecta por HPLC. En un aspecto, la cantidad de natamicina se puede medir en el plazo de 72 horas desde la finalización de la etapa de cocción, tal como en el plazo de 72 horas desde el envasado del producto. Como esta es la cantidad que queda después de la etapa de cocción, puede ser necesario incluir inicialmente una mayor cantidad de natamicina tal que permanezcan las cantidades descritas después de que al menos una porción de la natamicina se degrade durante la producción del queso procesado.

En algunos enfoques, el queso procesado incluye una cantidad de antimicótico natural eficaz para prevenir el crecimiento de mohos durante al menos aproximadamente tres meses, en otro aspecto al menos aproximadamente cuatro meses, en otro aspecto al menos aproximadamente cinco meses, en otro aspecto al menos aproximadamente seis meses, y en otro aspecto más al menos aproximadamente siete meses, cuando el queso procesado se almacena a aproximadamente 1 a aproximadamente 10 °C. La eficacia de la natamicina en el producto de queso procesado se puede determinar realizando un estudio de exposición a mohos, donde muestras del queso procesado se inoculan con una cantidad conocida de esporas de moho, tal como 90 ufc/g o 500 ufc/g, y se inspeccionan las muestras para el crecimiento visible de mohos durante el almacenamiento a 4,4 a 7,2 °C (40 a 45 °F).

30 El antimicótico natural comprende natamicina, también conocida como pimarcina. La natamicina se puede producir por fermentación usando *Streptomyces natalensis* u otro organismo que se ha modificado genéticamente para producir natamicina. Se pueden usar fuentes de natamicina comercialmente disponibles, si se desea, tales como NATAMAX™ SF (87 % en polvo de natamicina) de Danisco. También se puede incluir otros agentes antifúngicos naturales tales como, por ejemplo, polilisina (producida por ciertas especies de *Streptomyces*), si se desea.

35 El componente antibacteriano natural se incorpora en el queso procesado mediante componentes lácteos cultivados o componentes lácteos cultivados concentrados, que incluyen un componente antibacteriano natural y/o un cultivo capaz de producir un antimicrobiano natural en condiciones de fermentación apropiadas. Como se usa en el presente documento, los términos "componente lácteo cultivado" o "componente lácteo cultivado concentrado" generalmente se refieren a sustratos de leche cultivados o sus derivados que se han sometido, en algunos enfoques, a concentración y fermentación con cultivos productores de antimicrobianos seleccionados en condiciones eficaces para producir los péptidos antibacterianos, que es nisina, a menos que se identifique específicamente que no incluye componentes antibacterianos cultivados.

45 El componente antibacteriano natural se puede producir por fermentación usando una cepa productora de antibacteriano de bacterias ácido lácticas. Como se usa en el presente documento, el término "bacterias ácido lácticas" generalmente se refiere a bacterias Gram-positivas que generan ácido láctico como principal metabolito de la fermentación de hidratos de carbono. Las bacterias ácido lácticas pueden ser, por ejemplo, una cepa productora de antibacteriano de *Lactococcus lactis* o, en enfoques alternativos, *Brevibacterium linens*.

50 El componente antibacteriano natural es un péptido antibacteriano. El péptido antibacteriano es nisina y, en algunos enfoques, puede ser nisina A. la nisina es un péptido policíclico inhibidor con 34 restos de aminoácidos. Contiene los aminoácidos poco comunes lantionina, metil-lantionina, deshidroalanina y ácido deshidro-aminobutírico. Estos aminoácidos se sintetizan por modificaciones postraduccionales. En estas reacciones se convierte un 57-mero ribosómicamente sintetizado en el péptido final. Los aminoácidos insaturados se originan a partir de serina y treonina.

55 La nisina se puede obtener cultivando bacterias productoras de nisina sobre sustratos naturales, que incluyen leche. La nisina se ha incluido en productos alimenticios para prolongar la vida segura utilizable suprimiendo el deterioro por bacterias Gram-positivas y patógenas. Debido a su actividad altamente selectiva, también se puede emplear como un agente selectivo en medios microbiológicos para el aislamiento de bacterias Gram-negativas, levadura y mohos. Dos antimicrobianos comercialmente disponibles que contienen nisina son Nisaplin® y Novasin™ (ambos de Daniso A/S, Dinamarca). Normalmente, Nisaplin contiene menos de aproximadamente 3,0 % en peso de nisina,

consistiendo el resto en NaCl, proteínas, hidratos de carbono y humedad. Cuando se hace referencia a un componente de nisina en el presente documento, el componente puede incluir no solo nisina, sino también otros ingredientes, tales como vehículos, sales, proteína, hidratos de carbono y metabolitos que resultan del proceso de fermentación.

- 5 En un aspecto, el componente antibacteriano incluye nisina A. La nisina A tiene un peso molecular de aproximadamente 3.351,5 Da y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 1. Se debe entender que también se pueden utilizar otros antimicrobianos naturales en los productos de queso procesado descritos en el presente documento. Por ejemplo, se pueden incluir otras formas de nisina, que incluyen nisina Z, nisina Q, nisina F y nisina F. También se pueden incluir otras bacteriocinas, tales como las bacteriocinas de la clase I, bacteriocinas de la clase II, bacteriocinas de la clase III y bacteriocinas de la clase IV, a condición de que sean una forma de nisina.

Además, se pueden proporcionar cepas bacterianas que producen antimicrobianos naturales. Dichas cepas bacterianas incluyen, por ejemplo, cepas productoras de antibacterianos de bacterias ácido lácticas, tales como, por ejemplo, cepas productoras de nisina de *Lactococcus lactis* o *Brevibacterium linens*.

Queso procesado

- 15 En un enfoque, el queso procesado se puede producir mezclando juntos queso natural o mezcla de quesos naturales, humedad (por ejemplo, en forma de agua o leche ultrafiltrada), y una fuente de proteína láctea adicional opcional (tal como concentrado de proteína de la leche, suero lácteo, concentrado de proteína de suero lácteo, leche ultrafiltrada, y similares). El antimicótico natural, que es natamicina, también se puede añadir en este momento. Se puede añadir cloruro sódico para aroma. Se pueden añadir otros ingredientes opcionales para mejorar los atributos de textura, aroma, nutrición y/o coste. Estos incluyen, pero no se limitan a, ingredientes derivados de suero lácteo (por ejemplo, concentrado de proteína de suero lácteo), leche desnatada en polvo, concentrado de proteína de la leche, grasa de leche anhidra, gomas, almidones, gelatina, y similares. Se mezclan juntos los ingredientes y se transfieren a una olla (por ejemplo, una olla de cocción baja) y se calienta hasta temperaturas de pasteurización. Se añade a la olla la nisina, que está en forma de un componente lácteo cultivado. Puede ser deseable añadir la nisina a la olla, y no antes de la etapa de cocción, debido a que la nisina podría ser al menos parcialmente consumida, disminuyendo así su eficacia durante el almacenamiento, por cualquier microorganismo presente después de la etapa de mezcla. Opcionalmente, se puede aplicar cizallamiento durante o después del calentamiento para formar una masa sustancialmente homogénea. Entonces se envasa el producto en formas adecuadas o deseadas, tales como forma de loncha o barra.
- 20
- 25
- 30 La humedad se pueden añadir a la mezcla por cualquier método, tal como, pero no se limita a, inyectando vapor de agua en la olla, mezclando vapor de agua condensado de la cocción, y/o adición directa de agua. Por supuesto, la humedad también puede entrar en el sistema a través de los diversos ingredientes (por ejemplo, humedad del queso natural). En general, la humedad de los productos de queso final incluye toda la humedad, independiente de cómo se introdujo la humedad en el producto final. Ventajosamente, debido a que el componente lácteo cultivado incluye nisina, mejora el tratamiento del agua del queso procesado. Para este fin, debido a que la nisina y los otros ingredientes modificadores de la textura no necesitan ser añadidos por separado, se tiende a añadir menos agua al queso procesado mediante el ingrediente de componente lácteo cultivado.
- 35

- Proteína del suero lácteo se refiere a un conjunto de proteínas globulares que se pueden aislar del suero lácteo, que es el líquido que queda después de que la leche se haya cuajado y tensado. La proteína del suero lácteo normalmente es una mezcla de las proteínas beta-lactoglobulina, alfa-lactalbúmina y albúmina de suero. En una realización, se puede usar concentrado de proteína de suero lácteo (WPC) como la fuente de proteína de suero lácteo. El WPC deriva del suero lácteo por técnicas de concentración convencionales. La fuente de proteína de suero lácteo también puede incluir lactosa, vitaminas, minerales y grasa.
- 40

- Como se conoce por un experto habitual en la técnica, los ingredientes se pueden usar en cantidades variables en el queso procesado dependiendo del resultado deseado del producto de queso. Por ejemplo, para un producto de queso reducido en sodio, un fabricante de queso puede incluir una pequeña cantidad o nada de sal en la mezcla de queso. El queso procesado también puede incluir una gama 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.
- 45

- El queso procesado incluye 10 a 90 % de queso natural. Según otra forma, el queso procesado puede incluir aproximadamente 30 a aproximadamente 60 % de queso natural. Como se usa en el presente documento, queso natural se refiere a queso sin pasteurizar fabricado cuajando leche u otro líquido lácteo usando alguna combinación de cuajo (o sustituto de cuajo) y acidificación. El queso natural usado en el queso procesado descrito en el presente documento puede ser recién hecho o envejecido.
- 50

- En otra forma más, los quesos procesados en el presente documento pueden incluir aproximadamente 35 a aproximadamente 55 % de queso natural. Como se usa en el presente documento, el queso natural generalmente significa queso proporcionado a partir de queso no pasteurizado obtenido a partir de leche cuajada y uno de cuajo, sustitutos de cuajo, acidificación, y sus combinaciones.
- 55

El queso procesado también puede incluir varios otros ingredientes lácteos de diversas fuentes según se necesite para una aplicación particular. Por ejemplo y en una forma, el queso procesado puede incluir concentrado de proteína de la leche desde aproximadamente 0 hasta aproximadamente 50 % (en otros enfoques, aproximadamente 10 a aproximadamente 25 %), concentrado de proteína de suero lácteo desde aproximadamente 0 hasta aproximadamente 25 % (en otros enfoques, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 %), suero lácteo desde aproximadamente 0 hasta aproximadamente 30 % (en otros enfoques, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 %), grasa de la leche/nata desde aproximadamente 0 hasta aproximadamente 30 % (en otros enfoques, aproximadamente 1 a aproximadamente 15 %) y similares. El queso procesado también puede incluir emulsionantes, tales como citrato de sodio, fosfato de disodio y similares en una cantidad de aproximadamente 0 % a aproximadamente 5 % (en otros enfoques, aproximadamente 1 a aproximadamente 3 %). El queso procesado también puede incluir sal, aromatizantes, fortificaciones, colorantes y similares para proporcionar el color, aroma deseado, etc. El queso procesado también puede incluir agua y/o humedad añadida de los ingredientes para proporcionar la humedad del producto final deseado. Por ejemplo, también se pueden añadir vitaminas y otros minerales según se necesite para fortificar el queso procesado, por un enfoque, desde aproximadamente 0 hasta aproximadamente 3 por ciento de vitamina A, vitamina D y/o polvos de calcio (tal como fosfato de tricalcio). En otras aplicaciones, también se puede añadir sal según se necesite. En algunos enfoques, se puede añadir aproximadamente 0 a aproximadamente 5 por ciento de sal.

En lugar de conservantes tradicionales, el queso procesado incluye natamicina y un componente lácteo cultivado que contiene nisina. En un aspecto, el componente lácteo cultivado que contiene nisina se puede preparar mediante los métodos descritos en el presente documento. El queso procesado incluye 1 a 20 % de componente lácteo cultivado. En otra forma, el queso procesado incluye aproximadamente 4 a aproximadamente 10 % de componente lácteo cultivado. En algunos enfoques, los componentes lácteos cultivados de la presente divulgación proporcionan una actividad antimicrobiana total mucho mayor como equivalente de nisina con respecto al contenido de nisina (una relación de actividad de nisina). Por ejemplo y en algunos enfoques, los componentes lácteos cultivados y el queso procesado que utilizan las cantidades de componentes lácteos cultivados descritas en el presente documento presentan una relación de actividad de nisina de aproximadamente 0,3 o menos.

Se debe observar que los componentes antibacterianos naturales y antimicóticos naturales se pueden usar como una sustitución de conservantes artificiales. Cuando los quesos procesados incluyen los componentes lácteos cultivados en el presente documento, el queso puede estar sustancialmente libre de conservantes tradicionales, tales como ácido sórbico, nitritos y similares. Por un enfoque, sustancialmente libre de significa generalmente menos de aproximadamente 0,5 por ciento, en otros enfoques, menos de aproximadamente 0,1 por ciento, y en otros enfoques, no está presente en absoluto.

Los componentes antibacterianos naturales y/o antimicóticos naturales también se pueden usar para complementar o sustituir al menos parcialmente otros componentes en la composición de queso procesado general. Por ejemplo, dependiendo de la forma del componente lácteo cultivado, la cantidad del componente lácteo cultivado se puede usar para complementar o sustituir de otro modo una porción de los otros materiales lácteos en la composición, tales como la grasa de la leche, caseína, suero lácteo, y similares. En otras palabras, se puede modificar la relación de los otros materiales lácteos como resultado del uso de los componentes lácteos cultivados.

En una forma, el queso procesado incluye aproximadamente 40 % de queso natural, 35 % de otros materiales lácteos, aproximadamente 8 % de componentes lácteos cultivados, aproximadamente 12 % de agua y el resto sales, aromatizantes, colores, vitaminas, minerales y similares. El queso procesado se puede fabricar como generalmente se entiende con la adición de los componentes lácteos cultivados durante la cocción, y alternativamente, durante las etapas de mezcla de queso. En una forma, el producto de queso descrito en el presente documento puede ser cualquiera de una salsa de queso, un queso para untar, un bloque de queso, una loncha de queso, un queso rallado, o similares. En algunos enfoques, las diversas formas de queso procesado de la presente divulgación pueden incluir aproximadamente 10 a aproximadamente 90 % de queso natural, aproximadamente 0 a aproximadamente 50 % de concentrado de proteína de la leche, aproximadamente 0 a aproximadamente 30 % de grasa de la leche o nata, aproximadamente 40 a aproximadamente 60 % de agua, 1 a 20 % de componente lácteo cultivado, aproximadamente 0 a aproximadamente 30 % de suero lácteo, y aproximadamente 0 a aproximadamente 25 % de concentrado de proteína de suero lácteo en combinación con diversos aromas, sales y emulsionantes opcionales descritos anteriormente.

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

Aunque no se desea quedar limitado por la teoría, se cree que la matriz de queso proporcionada por el alto nivel de proteína, alto de grasa, y, en algunos casos, el menor nivel de humedad de los quesos procesados descritos en el presente documento, tiende a proteger y/o encapsular la natamicina de manera que sobreviva mejor a la etapa de cocción de queso procesado. Fue sorprendente e inesperado que se pudiera incluir dicha baja cantidad de natamicina en el queso procesado y todavía proporcionar estabilidad en almacén significativamente larga sin desarrollo de moho.

Aunque no se desea quedar limitado por la teoría, actualmente parece que el componente lácteo cultivado puede desempeñar una función en la protección de la natamicina durante la etapa de cocción. Se ha observado que los productos de queso procesado preparados con tanto natamicina como un componente lácteo cultivado proporcionados por los métodos descritos en el presente documento alteran la cantidad de natamicina detectable por HPLC durante el almacenamiento del producto. Por ejemplo, se encontró que la cantidad de natamicina detectable aumentaba en los meses 2 y 3 de almacenamiento y luego disminuía en el mes 4. Se cree actualmente que la matriz de queso cambia con el tiempo durante el almacenamiento, liberando así la natamicina en los meses 2 y 3 de manera que se pueda poner en contacto con e inactivar el moho presente en el producto. El contenido de natamicina disminuye entonces en el cuarto mes a medida que la natamicina es consumida por el moho. El aumento en el contenido detectable de natamicina durante el segundo y tercer meses fue bastante sorprendente ya que se esperaba en lugar de esto que la natamicina se degradara con el tiempo. Este efecto no se observó cuando se incluyeron nisina y natamicina en otros productos de queso, tales como productos de queso crema. Por tanto, se cree actualmente que la matriz de proteína y grasa única del producto de queso procesado, y posiblemente la proporcionada cuando el componente lácteo cultivado descrito en el presente documento se incluye en el producto de queso procesado, permite sorprendentemente incluir dichas bajas cantidades de nisina y natamicina mientras que proporciona todavía estabilidad microbiana y en anaquel deseada.

El queso procesado fabricado con los componentes lácteos cultivados de la presente divulgación también presenta características antimicrobianas mejoradas en el contexto de un producto de alto contenido de proteínas y bajo en grasa, tal como un queso procesado con aproximadamente 10 a aproximadamente 30 % de grasa y aproximadamente 8 a aproximadamente 25 % de proteína. Mientras que las formas comerciales anteriores de la nisina se entendieron comúnmente para inhibir *C. botulinum* en medios líquidos o caldo, cuando dichas formas anteriores de nisina se usaron en sistemas de alimentos de alto contenido de proteínas y alto en grasa, tales como queso procesado, la nisina fue menos eficaz en inhibir *C. botulinum* y otros patógenos. Aunque no se desea quedar limitado por la teoría, se cree que el nivel de alta proteína, alta grasa, y en algún caso, el menos nivel de humedad de los quesos procesados descritos en el presente documento, tienden a proteger y/o encapsular *C. botulinum* y otros patógenos convirtiendo la nisina tradicional y los antimicrobianos naturales tradicionales en menos eficaces. Se descubrió inesperadamente que la nisina obtenida a partir de los cultivos antimicrobianos en el presente documento, y en particular, la cepa 329, es eficaz para inhibir *C. botulinum* y otros patógenos transmitidos por los alimentos tales como *Listeria monocytogenes*, en el contexto de queso procesado de alto contenido en grasa y alto en proteínas, mucho mejor que otras formas de nisina como se muestran generalmente más adelante en el Ejemplo 1. El componente lácteo cultivado en queso procesado proporciona una cantidad de nisina eficaz para prevenir la formación de toxinas de al menos *C. botulinum* como se ha determinado por el bioensayo de toxinas convencional con ratones en el queso procesado a los altos niveles de proteína y los altos de grasa descritos en el presente documento durante al menos aproximadamente 9 días a aproximadamente 30 °C (86 °F). En un enfoque, el ensayo de biotoxina se pueden realizar según Haim M. Solomon et al., *Bacteriological Analytical Manual*, Capítulo 17, *Clostridium botulinum*, enero de 2001, disponible en <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070879.htm>, que se incorpora por este documento como referencia en su totalidad.

No solo son la natamicina y los componentes lácteos cultivados eficaces para inhibir moho, *C. botulinum* y otros patógenos en el contexto de un queso procesado de alta proteína y alta grasa, los componentes lácteos cultivados logran dichos efectos inhibidores a niveles de actividad más bajos y/o niveles más bajos de dosificación que los que previamente se encontraron que eran posibles.

En otros enfoques, formas líquidas de los componentes lácteos cultivados en el presente documento o fabricados por los procesos descritos en el presente documento retienen niveles más altos de actividad de nisina en el queso procesado final, que no se podía lograr usando las formas comerciales previas de nisina cuando se usa en quesos procesados. Por un enfoque, los ingredientes lácteos cultivados descritos en el presente documento y fabricados por los métodos descritos en el presente documento son eficaces para retener aproximadamente 50 a aproximadamente 90 por ciento de actividad, y en otros enfoques, 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 fabrica usando un líquido lácteo ultrafiltrado ya sea antes o después de la fermentación. En estos enfoques, 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 como ácido. En otros enfoques, el componente lácteo cultivado y el queso procesado que utilizan el componente lácteo cultivado pueden también tener menos de aproximadamente 600 mg/100 gramos de calcio.

Producción de componente antibacteriano para su uso en queso procesado

En una forma, un componente lácteo cultivado para su inclusión en los productos de queso procesado descritos en el presente documento incluye un sustrato lácteo fermentado con un cultivo productor de antimicrobiano. En algunos enfoques, el sustrato lácteo es un líquido lácteo, tal como leche o un líquido lácteo concentrado o sustrato de leche,

tal como un sustrato de leche 2-5X concentrado. El cultivo productor de antimicrobiano es un cultivo productor de nisina. En una forma particular, la nisina producida por el cultivo es nisina A.

Volviendo a más de los detalles con respecto a los métodos de producción de un concentrado lácteo cultivado eficaz y queso procesado y primero con referencia a la FIG. 1, se proporciona un diagrama de flujo de proceso 10 que ilustra un método de producción de un material lácteo cultivado o concentrado lácteo cultivado 12 eficaz para producir un antibacteriano (tal como nisina A), el producto del cual es eficaz para su uso con queso procesado. En este proceso 10 a modo de ejemplo, se puede usar un material de partida lácteo líquido 14, tal como un líquido lácteo como leche entera. En otros enfoques, el líquido lácteo inicial se puede concentrar de proteína de la leche y o materiales de suero lácteo. El material de partida 14 puede tener desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 35 % de sólidos totales, aproximadamente 0 a aproximadamente 16 por ciento de grasa, aproximadamente 1 a aproximadamente 14 por ciento de proteína, y aproximadamente 64 a aproximadamente 95 por ciento de humedad. En otra forma, el material de partida 14 es leche entrada 3,5X concentrada que tiene aproximadamente 26 a aproximadamente 30 por ciento de sólidos totales, aproximadamente 10 a aproximadamente 15 por ciento de grasa, aproximadamente 8 a aproximadamente 12 por ciento de proteína, y aproximadamente 70 a aproximadamente 70 por ciento de humedad.

En otro enfoque, el material de partida 14 es un líquido lácteo concentrado obtenido de la ultrafiltración de leche láctea líquida. El material de partida concentrado se puede concentrar hasta una concentración de 2X a 5X como se ha determinado por sólidos totales, en otros enfoques, aproximadamente un líquido lácteo 2X a aproximadamente 4X, y en aún otros enfoques, aproximadamente 3X a aproximadamente 3,5X. Es decir, una concentración 3X tiene 3 veces el nivel de sólidos totales con respecto a un líquido lácteo inicial, y una concentración 5X 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 un material de partida concentrado apropiado. Una membrana adecuada tiene un corte de peso molecular de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 KD. También se puede usar otros métodos de concentración que incluyen microfiltración, nanofiltración, y osmosis inversa según se necesite para una aplicación particular.

Como se trata más adelante, la fermentación en leches concentradas, tales como la leche 2X a 5X de la presente divulgación, normalmente presenta problemas con cultivos antimicrobianos previos y fermentaciones. La cepa 329 usada dentro de los productos y métodos de la presente divulgación permite únicamente la fermentación en un líquido lácteo concentrado y, al mismo tiempo, permite la formación de nisina. Utilizando las leches concentradas para la fermentación y la producción definitiva de los ingredientes de queso procesado en el presente documento, se controla mejor el contenido de agua en el queso del proceso resultante. En algunos enfoques, esto reduce la carga de humedad total en el proceso de fabricación de queso procesado y, en algunos casos, también simplifica la línea de ingredientes del queso procesado.

El material de partida 14, que es o bien un componente lácteo líquido o lácteo líquido concentrado, se pasteuriza entonces y luego entra en uno o más fermentadores 18. La pasteurización puede ser aproximadamente 65,6 a aproximadamente 87,8 °C (150 a 190 °F) durante aproximadamente 20 a aproximadamente 40 segundos dando como resultado una temperatura de salida del material de partida pasteurizado de aproximadamente 26,7 a aproximadamente 32,3 °C (80 a 90 °F). Se añade un cultivo productor de antimicrobiano 20, tal como la cepa 329 de *Lactococcus lactis*, al fermentador 18 junto con una disolución base 22 tal como hidróxido sódico (por ejemplo, un hidróxido sódico 5,5 N diluido). En una forma, se añade aproximadamente 2×10^6 a aproximadamente 2×10^8 UFC/mL del cultivo productor de antimicrobiano 20 al fermentador. En una realización, el cultivo 20 es una forma descongelada del cultivo. En un enfoque, la temperatura de fermentación se mantiene a aproximadamente 25 a aproximadamente 35 °C (en algunos enfoques aproximadamente 28 a aproximadamente 32 °C, y en otros enfoques, aproximadamente 30 °C) y un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 (en otros enfoques, aproximadamente 5,4 a aproximadamente 5,8, y en aún otros enfoques, aproximadamente 5,4 a aproximadamente 5,6) en el fermentador. También se pueden usar otras temperaturas y pH si el cultivo es capaz de producir nisina a un nivel deseado en las condiciones seleccionadas. Por ejemplo, en un enfoque, el pH varía desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 7 y la temperatura varía desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 40 °C. La composición se puede fermentar a lo largo de una variedad de diferentes periodos de tiempo para conferir diferentes características de aroma a la composición. Por ejemplo, en un enfoque, la composición se fermenta durante aproximadamente 18 a aproximadamente 22 horas. En otra forma, la fermentación puede tener lugar durante un intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 48 horas.

La composición se envía a continuación a un dispositivo de cizallamiento opcional 24 para cizallar cuajadas pequeñas/blandas que se puedan haber formado. En un enfoque, el dispositivo de cizallamiento puede ser una mezcladora de rotor/estator (tal como Dispax) u otro dispositivo de cizallamiento de rotor. Esta etapa puede ser opcional dependiendo de las otras condiciones de procesamiento, así como las propiedades de los materiales utilizados en el proceso. La composición se somete entonces finalmente a una etapa de tratamiento térmico opcional 26. En una forma, la composición se trata con calor 26 a aproximadamente 65,6 a aproximadamente 71,1 °C (150 °F a 160 °F) durante aproximadamente 60 a aproximadamente 100 segundos. En otra forma, la composición se trata con calor para reducir UFC/mL hasta inferiores a aproximadamente 1000 UFC/ mL. La composición resultante 12 es un componente lácteo cultivado o concentrado lácteo cultivado que incluye nisina y/o un material productor de nisina. Al menos en algunos enfoques, estos dos componentes se producen ventajosamente a partir de la misma cepa

bacteriana inicial, tal como la cepa 329, y en las mismas condiciones de fermentación. La composición puede estar en forma de un líquido que tiene aproximadamente 6 a aproximadamente 40 % de sólidos totales. En una forma, el líquido tiene aproximadamente 20 a aproximadamente 30 % de sólidos totales, y en algunos enfoques aproximadamente 28,5 % de sólidos totales.

5 En un método alternativo 200 mostrado en la FIG. 1A, se pueden calentar primero 204 polvos hidratados y/o leche líquida 202, tal como en una esterilización de corto tiempo a alta temperatura (HTST) o una etapa de proceso de esterilización a temperatura ultra-alta (UHT). A continuación, el líquido calentado se fermenta 206 entonces con materiales, cultivos, y condiciones similares como se describe con respecto al método previamente tratado. Después de la fermentación, el material se puede cizallar opcionalmente 208 y luego concentrar 210. En este enfoque, la
10 concentración puede ser filtración en membrana, evaporación, o centrifugación. Después de la concentración, el concentrado resultante se puede calentar opcionalmente 212 otra vez usando, por ejemplo, HTST o UHT.

Otro proceso 100 para preparar componentes lácteos cultivados se ilustra en la FIG. 2. El proceso 100 en la FIG. 2 utiliza materiales de partida en polvo 112 tales como concentrado de proteína de la leche en polvo y suero lácteo en polvo. En este enfoque, se mezclan aproximadamente 3 a aproximadamente 10 por ciento de concentrado de proteína de la leche en polvo, aproximadamente 2 a aproximadamente 6 por ciento de suero lácteo en polvo, y aproximadamente 75 a aproximadamente 95 por ciento de agua en un tanque o un fermentador 118 para formar el medio de fermentación. Los polvos se pueden mezclar 114 e hidratar antes de ser añadidos al fermentador 118. Estos materiales de partida se combinan entonces con un cultivo productor de antimicrobiano 120, tal como la cepa 329 de *Lactococcus lactis*, en una cantidad de aproximadamente 2×10^6 UFC/mL a aproximadamente 2×10^8 UFC/mL
15 en el recipiente de fermentación 118 y se fermentan de una manera similar como se describe para la FIG. 1. Similar al método de la FIG. 1, también se puede añadir agua de proceso y una base, tal como un hidróxido sódico diluido al recipiente de fermentación 118 del tanque 123. Después de la fermentación, la composición se puede calentar o enfriar opcionalmente según sea necesario y luego preparar en un componente lácteo cultivado 112 final. En algunos enfoques, el proceso puede incluir diversos calentamientos y enfriamientos intermedios 132 según se necesite para una aplicación particular. A este respecto, la composición 112 se puede poner en uno o más tanques de contención 130 u otra localización de almacenamiento para su uso en una forma líquida concentrada. Las temperaturas del tanque de contención pueden ser aproximadamente -1,1 a aproximadamente 10 °C (30 a 50 °F). En una realización (tal como en una forma líquida), el componente lácteo cultivado tiene desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 11 % de sólidos totales y, en otra forma, aproximadamente 20 % de sólidos totales.
20 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 la secadora de aproximadamente 71,1 a aproximadamente 82,2 °C (160 a 180 °F) y aproximadamente a 103421 a aproximadamente 172369 Pa (15 a 25 psi) de caída de presión.

El componente lácteo cultivado puede adoptar una variedad de formas. Por ejemplo, como se muestra en las FIG. 1 y 2, el componente lácteo cultivado puede estar en forma de un líquido. El componente lácteo cultivado puede también adoptar la forma de un polvo, tal como de secado por pulverización como se muestra en la FIG. 2. Además, el componente lácteo cultivado también puede estar en una forma concentrada, tal como los componentes obtenidos por evaporación, filtrado y similares. El producto resultante del método de las FIG. 1 o 2 puede ser tanto un líquido como secado por pulverización dependiendo de la aplicación particular. La FIG. 2 proporciona a modo de ejemplo
25 etapas para el secado por pulverización y se apreciará que estas etapas también se pueden usar con los métodos de la FIG. 1. Se apreciará que si el componente lácteo cultivado se procesa además por concentración, secado por pulverización, o similares, este procesamiento adicional se completará de un modo que no afecte sustancialmente la nisina.

El componente lácteo cultivado producido por los métodos de las FIG. 1 y 2 se puede entonces usar en y/o para
30 fabricar queso procesado.

Como se describe en el presente documento, el término unidad de actividad ("UA") se puede usar para describir la actividad biológica del antimicrobiano natural en el componente lácteo cultivado y queso procesado en el que se incorpora el antimicrobiano. Se debe entender que la actividad biológica también se puede expresar en unidades internacionales ("UI") de forma que se pueden usar indistintamente UA y UI. En algunos enfoques, los componentes
35 lácteos cultivados de la presente divulgación y los quesos procesados preparados con los mismos pueden tener actividad de nisina en el queso procesado de aproximadamente 40 a aproximadamente 400 UI/gramo y, en otros enfoques, aproximadamente 50 a aproximadamente 200 UI/gramo.

En una forma, 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
40 medio de fermentación.

El antibacteriano natural se puede proporcionar cultivando las bacterias productoras de antimicrobiano en condiciones de fermentación apropiadas en un sustrato lácteo. El sustrato lácteo puede incluir, por ejemplo, leche, nata, suero lácteo u otros polvo o líquido que contiene lácteo. El sustrato lácteo también puede comprender dextrosa, jarabe de maíz u otros hidratos de carbono complementados con otros nutrientes para el crecimiento
45 bacteriano, con o sin un neutralizador de 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 producto de leche al menos aproximadamente 2x concentrado, en otro aspecto producto de leche hasta aproximadamente 5x concentrado. Normalmente, la base de leche contendrá más de aproximadamente 3 por ciento de lactosa y una fuente de nitrógeno. La base se puede producir a partir de polvos hidratados o derivar de líquidos lácteos frescos, tales como leche desnatada, leche al dos por ciento, leche entera, y similares. Por un enfoque, el sustrato lácteo inicial incluye leche concentrada que tiene sólidos totales 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 usa en la producción de queso procesado, se ha encontrado que se desea mantener un bajo nivel de humedad en el sustrato lácteo para reducir el aumento de costes asociados a la retirada de la humedad del componente lácteo cultivado antes de la inclusión en el producto de queso procesado. Además, ciertos componentes del componente lácteo cultivado pueden ser inestables y se pueden degradar o dañar de otro modo durante un proceso de retirada de humedad. Sin embargo, el componente lácteo cultivado que incluye antimicrobianos cultivados puede adoptar una variedad de formas tales como líquido y/o polvo, si se desea, para una aplicación particular.

Al menos en algunos enfoques, el cultivo productor de nisina A usado en el presente documento es la cepa 329 de *Lactococcus lactis* ss. *lactis*. El 21 de agosto de 2013, la cepa 329 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110, y el número de acceso dado PTA-120552. El depósito se hizo según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional de Depósito de Microorganismos a efectos del procedimiento de patente. La cepa 329 también se describe en detalle en la solicitud de patente U.S. N° 13/973.660, presentada el 22 de agosto de 2013.

Se ha encontrado que la cepa 329 de *Lactococcus lactis* tiene un perfil genético y de fagos único en comparación con otras cepas productoras de nisina de bacterias ácido lácticas. Ventajosamente, también se encontró que la cepa 329 era capaz de crecer en sustratos lácteos concentrados, que incluye aproximadamente una leche 2X a aproximadamente 5X. Se ha encontrado que algunos cultivos son capaces de crecer en dichos sustratos de leche altamente concentrada. Por ejemplo, los cultivos en el presente documento son eficaces para crecer en al menos aproximadamente 10⁹ UFC/gramo en aproximadamente 10 horas y producir más de aproximadamente 2000 UI de nisina A/gramo en aproximadamente 18 horas incluso en el medio de fermentación concentrado de aproximadamente 2x a aproximadamente 5x. La cepa 329 se caracterizó usando tipificación multilocus de secuencias (MLST), tipificación de fagos y ribotipificación como se trata más adelante.

Tipificación multilocus de secuencias (MLST)

Se usó el genoma públicamente disponible de *L. lactis* subsp. *Lactis* IL 1403 (taxid:272623), también una cepa productora de nisina, como molde para la selección de siete genes de mantenimiento que se iban a usar como marcadores genéticos en una comparación de IL 1403 con la cepa 329. Los genes seleccionados cubren un intervalo de loci en el cromosoma como se detalla en la Tabla 1 a continuación. Se amplificó y secuenció cada uno de los siete genes. Entonces se alinearon las secuencias y se compararon usando IL1403 como referencia. Se consideró cada variación de secuencia y se representa un alelo individual.

Tabla 1

Gen	Proteína	Locación del cromosoma
acmD (SEQ ID NO 2)	n-acetilmuramidasa	527.413-528.498
gapB (SEQ ID NO 3)	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	2.332.466-2.333.476
pdhD (SEQ ID NO 4)	Componente de lipamida deshidrogenasa de piruvato deshidrogenasa	58.971-60.389
pepC (SEQ ID NO 5)	Aminopeptidasa C	1.947.325-1.948.635
thiE (SEQ ID NO 6)	Tiamina fosfato pirofosforilasa	1.293.610-1.294.257
yjD (SEQ ID NO 7)	Proteína permeasa transportadora de ABC	993.341-994.963
yyaL (SEQ ID NO 8)	Proteína de unión a GTP	11.119-12.234

Tipificación de fagos

Se usaron placas para tinción para el perfilado de fagos de disoluciones madre de fago de alto título. Se identifican los fagos y se presentan los resultados de la tipificación de fagos en la FIG. 4.

Ribotipificación

5 Como se usa en el presente documento, "ribotipificación" se refiere a la huella de fragmentos de restricción de ADN genómico que contienen todo o parte de los genes que codifican el ARNr 16S y 23S. Se llevaron a cabo técnicas de ribotipificación convencionales utilizando EcoRI como enzima de restricción. Los resultados se muestran en la FIG. 5. La ribotipificación confirmó que la cepa 329 de *Lactococcus lactis* es sustancialmente diferente de la cepa ATCC 11454 de *Lactococcus lactis* públicamente disponible, también una cepa productora de nisina.

Análisis de secuencias de ADN

10 Se encontró que la cepa 329 de *Lactococcus lactis* tiene una combinación única de exopolisacárido y genes de agrupación de nisina como se muestra en la FIG. 6. La cepa 329 de *Lactococcus lactis* incluye la secuencia de genes de agrupación de nisina de la Tabla 2 a continuación y produce nisina A que tiene la secuencia de aminoácidos de la FIG. 7 (SEQ ID NO 1).

Tabla 2

GEN	Número SEQ ID
Precursor de nisina nisina A	SEQ ID NO 9
Proteína transportadora de nisina (nisG)	SEQ ID NO 10
Proteína transportadora de nisina (nisE)	SEQ ID NO 11
Proteína transportadora de nisina (nisF)	SEQ ID NO 12
Sistema de dos componentes de nisina, regulador de la respuesta (nisR)	SEQ ID NO 13
Histidina cinasa de sensor-receptor de nisina (nisK)	SEQ ID NO 14
Serina proteasa procesadora de péptidos conductores de nisina (nisP)	SEQ ID NO 15
Proteína de inmunidad de nisina	SEQ ID NO 16
Proteína de la biosíntesis de nisina (nisC)	SEQ ID NO 17
Proteína de unión a ATP de transporte de nisina (nisT)	SEQ ID NO 18
Proteína de la biosíntesis de nisina (nisB)	SEQ ID NO 19

15 Se ha encontrado que, al menos en las condiciones de fermentación descritas en el presente documento con referencia al método de la FIG. 1, la cepa 329 de *Lactococcus lactis* produce un alto nivel de nisina A 34-mera con respecto al péptido precursor de nisina A 57-mera (el precursor de nisina A tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 20). La nisina A se produce por modificación postraducciona del precursor de nisina A. Al menos en algunos enfoques, la cepa 329 de *Lactococcus lactis* produce nisina A con respecto al precursor de nisina A a una relación de al menos aproximadamente 9:1, en otro aspecto al menos aproximadamente 9,5:0,5. A diferencia, Nisaplin® de Danisco incluye aproximadamente 83 por ciento de nisina A y 17 por ciento de precursor de nisina A.

20 En las mismas condiciones de fermentación eficaces para producir la nisina A descrita anteriormente, la cepa 329 de *Lactococcus lactis* también produce exopolisacárido, tal como, por ejemplo, en las condiciones de fermentación descritas en el presente documento con referencia al método de la FIG. 1. La cepa 329 de *Lactococcus lactis* incluye los genes de la agrupación de EPS de la Tabla 3 a continuación:

25 Tabla 3

GEN	Número de SEQ ID
Regulador de la transcripción, familia XRE	SEQ ID NO 21
Esterasa (EpsX)	SEQ ID NO 22
Modulador transmembranario de la proteína tirosina cinasa (epsC)	SEQ ID NO 23
Proteína tirosina cinasa	SEQ ID NO 24
Undecaprenil-fosfato galactosa fosfotransferasa	SEQ ID NO 25

GEN	Número de SEQ ID
Proteína tirosina fosfatasa dependiente de manganeso	SEQ ID NO 26
Proteína de la biosíntesis de polisacáridos (cpsF) /glucosil transferasa (cpsG)	SEQ ID NO 27
Proteína de la biosíntesis de glucosil transferasa (cpsG) / polisacárido (cpsM(v))	SEQ ID NO 28
Proteína de la familia 2 de glucosiltransferasa	SEQ ID NO 29
Azúcar transferasa (epsL)	SEQ ID NO 30
Proteína de función desconocida, familia desconocida	SEQ ID NO 31
Proteína de función desconocida, familia desconocida / beta-1,3-glucosiltransferasa	SEQ ID NO 32
Proteína de la biosíntesis de polisacáridos (cpsM(v))	SEQ ID NO 33

Al menos en algunos enfoques, una cepa bacteriana productora de antimicrobiano útil en los métodos descritos en el presente documento es capaz de producir tanto nisina A de aproximadamente 2000 UI/gramo o más como exopolisacárido en las condiciones de fermentación descritas en referencia a la FIG. 1.

- 5 La información de la secuencia proporcionada en el presente documento no debe interpretarse tan estrechamente de manera que requiera la inclusión de nucleótidos erróneamente identificados. Las secuencias desveladas en el presente documento se pueden usar por un experto habitual en la técnica para aislar el gen completo de la cepa bacteriana y someter el gen a un análisis de secuencias adicional para identificar cualquier error de secuenciación.

10 Como se usa en el presente documento, se usan indistintamente los términos "homología" e "identidad". Para los fines de determinar el porcentaje de identidad u homología de dos secuencias, las secuencias se pueden alinear para fines de comparación óptima. Los nucleótidos o aminoácidos se comparan entonces en posiciones de nucleótidos o de aminoácidos correspondientes de las dos secuencias. Por ejemplo, un nucleótido o aminoácido en una primera secuencia se considera idéntico al de la segunda secuencia cuando el mismo nucleótido o aminoácido se localiza en la posición correspondiente en la segunda secuencia. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas dividido entre el número total de posiciones (es decir, posiciones superpuestas) multiplicado por 100.

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

- 20 En una forma, una cepa bacteriana productora de antimicrobiano útil en los métodos descritos en el presente documento tiene uno o más genes de homología significativa con SEQ ID NO 9-19 y 21-33 y es capaz de producir nisina A. Como se define en el presente documento, 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, en otro aspecto más al menos 99 por ciento de identidad, y en otro aspecto identidad más completa.

30 En algunos enfoques, una cepa bacteriana productora de antimicrobiano útil en los métodos descritos en el presente documento tiene al menos dos genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO 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 SEQ ID NO 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 SEQ ID NO 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 SEQ ID NO 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 SEQ ID NO 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 SEQ ID NO 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 SEQ ID NO 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 SEQ ID NO 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 SEQ ID NO 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 SEQ ID NO 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 SEQ ID NO 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 SEQ ID NO 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 SEQ ID NO 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 SEQ ID NO 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 SEQ ID NO 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 SEQ ID NO 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 SEQ ID NO 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 SEQ ID NO 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 SEQ ID NO 9-19 y 21-33, en otro aspecto tiene al menos veintiún genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO 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 SEQ ID NO 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 SEQ ID NO 9-19 y 21-33, y en otro aspecto más tiene al menos veinticuatro genes de homología significativa con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO 9-19 y 21-33.

Las ventajas y realizaciones de las composiciones, métodos y composiciones producidos por los métodos descritos en el presente documento se ilustran además por los siguientes ejemplos; sin embargo, no se debe interpretar que las condiciones particulares, esquemas de procesamiento, materiales y sus cantidades citadas en estos ejemplos, así como otras condiciones y detalles, limiten indebidamente este método. Todos los porcentajes y relaciones dentro de la presente divulgación son en peso, a menos que se indique lo contrario.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran el rendimiento de lonchas de queso procesado preparadas con componentes lácteos cultivados como se ha descrito anteriormente y muestras de control de queso de proceso sin el componente lácteo cultivado sino, en su lugar, usando ácido sórbico como conservante. Las muestras se prepararon generalmente como lonchas de queso procesado que tenían 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 (donde se indique), aromas, colores, vitaminas, minerales y similares.

Ejemplo 1 (comparativo)

Se incorporó natamicina (Natamax SF de Danisco) en el queso procesado (antes de la etapa de cocción) a concentraciones de 7 ppm y 15 ppm. Entonces se sometió el queso procesado a un estudio de exposición a mohos. Se inoculó el queso procesado con una mezcla de mohos (esporas en medios líquidos) de *Phoma spp.*, *Geotrichum spp.*, *Cladosporium spp.* y *Penicillium spp.* (que representan tipos comunes de moho) a 90 esporas por 19 gramos de loncha. Las muestras se inoculan extendiendo la mezcla encima de las lonchas de queso. No se inoculó un control. El queso procesado que contenía la natamicina prolongó significativamente la estabilidad en almacén durante al menos seis meses más que un control que careció del inhibidor de moho. Se encontró sorprendentemente que el queso que contenía natamicina fue eficaz en prolongar la estabilidad en almacén más allá de seis meses cuando se almacenó a 7,2 °C (45 °F) aún cuando la concentración detectable de natamicina en el producto había disminuido hasta 0,62 ppm (para la muestra de 7 ppm) y 4,89 ppm (para la muestra de 15 ppm) por seis meses. Se determinó el nivel detectable de natamicina por HPLC.

Ejemplo 2

Se incorporó natamicina (Natamax SF de Danisco) en el queso procesado (antes de la etapa de cocción) a concentraciones de 0 ppm (comparativo), 10 ppm y 15 ppm. Se prepararon cuatro muestras de cada dosis. Se incorporó el componente lácteo cultivado que contenía nisina en todos los productos a 8 por ciento basado en el peso total del queso procesado. Cuando se midió tres días después de producir el queso procesado, las muestras que empezaron con 10 ppm y 15 ppm de natamicina tuvieron, en promedio, 2,8 ppm y 4,9 ppm de natamicina, respectivamente.

Los productos se inocularon a 500 ufc/g o 9500 ufc/loncha con la mezcla de mohos del Ejemplo 1 aplicando la mezcla a la superficie de las lonchas de queso y dejando los envases abiertos. Otros envases del queso procesado (no inoculados con la mezcla de mohos) se perforaron intencionadamente para proporcionar orificios en el envase para simular una situación del mundo real. Los resultados de la inoculación de 9500 esporas por loncha (designado "sin fuga") y los experimentos en envases perforados (designados "con fuga") se muestran en la FIG. 3. Estas muestras presentaron estabilidad en almacén de casi el doble que las de control cuando se inocularon con 500 ufc/g o 9.500 esporas por loncha de queso procesado, incluso con el nivel de inoculación extremadamente grande de 9.500 esporas/loncha.

Ejemplo 3 (comparativo)

Se produjeron lonchas de queso procesado que contenían aproximadamente 4,8 ppm de natamicina (Natamax SF de Danisco). Las lonchas no tuvieron moho visible a los cinco meses de estabilidad en almacén cuando se almacenaron a 7,2 °C (45 °F), mientras que un control sin natamicina mostró moho visible a los tres meses.

5 **Ejemplo 4**

Se incorporó natamicina (Natamax SF de Danisco) en el queso procesado (antes de la etapa de cocción) a 15 ppm. Se incorporó el componente lácteo cultivado que contenía nisina en los productos a 8 por ciento basado en el peso total del queso procesado. Se inocularon las muestras del queso procesado a 100 ufc/g y 500 ufc/g. Se encontró que el nivel detectable de natamicina cambió durante el almacenamiento del producto a 7,2 °C (45 °F) como se muestra en la Tabla 4 a continuación. Se determinó el nivel detectable de natamicina por HPLC.

10

Tabla 4

Nivel de dosis de natamicina	Concentración de natamicina detectada (ppm) después de una semana	Concentración de natamicina detectada (ppm) después de dos meses	Concentración de natamicina detectada (ppm) después de tres meses	Concentración de natamicina detectada (ppm) después de cuatro meses
15 ppm	4,63	6,81	6,78	3,28
15 ppm	4,80	5,67	7,36	3,14
15 ppm	4,61	6,73	6,87	3,07
15 ppm	-	4,62	6,34	3,39
15 ppm	-	6,32	7,46	3,64
15 ppm	-	5,34	6,13	2,97
15 ppm	-	5,91	6,84	3,37
	Promedio = 4,68	Promedio = 5,93	Promedio = 6,77	Promedio = 3,39

En aproximadamente tres meses, parece que el nivel detectable de natamicina alcanza su máximo a un promedio de 6,8, que es ventajoso desde una perspectiva comercial ya que el producto de queso procesado puede seguir disponible en las tiendas a los tres meses.

15

Listado de secuencias

<110> Kraft Foods Group Brands LLC

<120> QUESO PROCESADO CON COMPONENTES ANTIBACTERIANOS Y ANTIMICÓTICOS NATURALES Y MÉTODO DE FABRICACIÓN

20

<130> PJF11460EP

<140> EP 14821401.8

25

<141> 09-12-2014

<150> PCT/US2014/069278

<151> 09-12-2014

<150> US 61/914246

<151> 10-12-2013

<160> 33

5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 34

10

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

15

<222> (2)..(2)

<223> Deshidrobutirina (beta-metildeshidroalanina)

<220>

<221> TIOÉT

20

<222> (3)..(7)

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (5)..(5)

25

<223> Deshidroalanina

<220>

<221> TIOÉT

<222> (8)..(11)

30

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (8)..(8)

<223> Ácido aminobutírico

35

<220>

<221> TIOÉT

<222> (13)..(19)

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

5 <222> (13)..(13)
 <223> Ácido aminobutírico

<220>
 <221> TIOÉT

10 <222> (23)..(26)

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

15 <222> (23)..(23)
 <223> Ácido aminobutírico

<220>
 <221> TIOÉT

20 <222> (25)..(28)

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

25 <222> (25)..(25)
 <223> Ácido aminobutírico

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

30 <222> (33)..(33)
 <223> Deshidroalanina

<400> 1

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

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

Xaa Lys

ES 2 735 996 T3

<210> 2

<211> 1086

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

5

<400> 2

```

atgaaacaga aacataaatt agcgcttggg gcgtcaattg ttgctttggc aagtcttggg      60
gggattaaag cacaagctgc atctgttcaa gaaattatta acgctgcggg accagtgcca      120
aatgactacg gactttatcc atcagtaatg attgcccaag ggattttaga atcaagtggg      180
ggacaaagtg ccttagcaag caattataat aatatttttg gagttaaata cacttctggg      240
acacctgttt atctaccaac acaagagtat ttgaatggaa caatgacaaa tgttgttgaa      300
ccctccaag cttatagctc agtttatgac gcatgtgttg cccaagctaa aatgttacgt      360
gcttcatcat attattctgg ggcttggcgt gaaaatacaa gttcttactt agatgcgaca      420
gcttggttg aaggacgta tgccacggat ccaacttatg cttctaaatt gaatagcgtg      480
atctctgaac ttggtttaag tgtttatgac caaggaggag aaatatcagg aggaactgct      540
gttacaacta gttcatcagc ctcaacaaat tcagctggca catacaaagt acaagagggt      600
gattcattat cagcaatcgc tgctcaatat ggtacaactg ttgatgcact tgtgtcagca      660
aatagtttag aaaatgcgaa cgatattcat gtaggagaag ttttgcaagt tgctggtgct      720
agcacaacta caacaagtac caatacaact tccaatgtat cgtcaagttc tacttatacc      780
gtcaaatcag gagatagttt atattcgatt gcggaacaat atggaatgac tgtttcatca      840
ctgatgtcag ccaatggaat ttatgatggt aattcaatgc ttcaagtagg acaagtattg      900
caagtaactg taagtactag tgcaacaact tcaaacacaa cgacttcaaa cagttataca      960
attcaaaatg gtgacagcat ttattcaatt gccacagcaa atgggatgac agctgaccaa     1020
ttagcagccc tcaatggatt tggaattaat gacatgattc atccaggaca acaattaga     1080
atctaa                                           1086
    
```

10

<210> 3

<211> 1011

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

15

<400> 3

ES 2 735 996 T3

atggtagtta aagttggtat taacggtttc ggtcgtatcg gtcgtcttgc tttccgctcg	60
attcaaaatg ttgaaggtgt tgaagttggt gcaatcaacg acttgacaga tccagcaatg	120
cttgctcact tgcttaaata cgatacaact caaggtcgtt ttgatggtaa agttgaagtt	180
aaagatggtg gttttgaagt taacggtaaa ttcgttaaag ttactgctga atctaacca	240
gctaacaatca actgggctga agttggtgca gaaatcgttc ttgaagcaac tggtttcttc	300
gcaactaaag aaaaagctga acaacacttg cacgctaacg gtgctaaaa agttgttctc	360
actgcacctg gtggatctga tgttaaaaca atcgttttca aactaacca cgaagtactt	420
gatggaactg aaacagtaat ttcagctggt tcatgtacaa ctaactgtct tgctccaatg	480
gctgatactt tgaacaaaca attcggtatc aaagttggtt caatgactac agttcacggt	540
tacactggtg accaaatgac tcttgatggc ccacaccgtg gtggagactt ccgtcgcgca	600
cgtgctgcag ctgaaaacat cgtacctaac tcaacagggt ctgctaaagc tatcgggtctt	660
gtattgccag aacttcaagg taaacttcaa ggacatgctc aacgtgtacc agttccaact	720
ggttcattga ctgaacttgt tactatcctt aacaaagaag ttacagttga cgaaatcaac	780
gcagctatga aagctgcttc aaatgaatca tttggttaca acgaagacca aatcgtttca	840
tctgatatcg ttggtatctc aaactcttca ctctttgatg ctactcaaac tgaagttact	900
tcagctgatg gagctcaact tgttaaaact gtatcttgggt acgataacga aatgcatcac	960
acttcaaacc ttgttcgtac acttgcatcac ttcgctaaaa tcgctaaata a	1011

<210> 4

<211> 1419

5

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 4

ES 2 735 996 T3

atggttggtg gtgcacaagc aacagaagtt gatttggttg ttattggttc aggcctggt 60
 ggttatggtg cagccatccg tgcggctgaa cttggtaaaa aagttacaat tattgaaaa 120
 gataatggtg gtgggggttg tttaaatatt ggttztatcc catcaaaagc attgattaat 180
 attggtcatc attaccaaga atctttggag gaagaaaaag gagaaaatcc ttttggctct 240
 tctgtcggaa atgttaaatt aaactgggaa tctgcccaaa aatggaaaca agataaagtt 300
 gtcaaccagt tgacaggtgg tgttaaaatg ctacttaaaa aacacaaagt tgacgtgatt 360
 caaggaactg cagaatttat tgataacaat acaataaatg ttgaacaaga agatgggttc 420
 caacttttgc aatttaatga tgtgattatc tcaactggtt cacgtcctat cgaaattcct 480
 tctttcccat ttgggtggtcg cattattgac tctactggtg ctttgtcact tccagaagtt 540
 cctaaacatt tgattattgt tgggggagga gtatttggtt ctgagcttgg tggagcatac 600
 cgtatgctcg gttctaagat tacaattggt gaagggttgg accacathtt aaacgggttt 660
 gataaagaaa tgtctgatat cattgcta atcgcgttaaat ctgctggttc tgaaatcttt 720
 acttcagcaa tggctaaatc agctactcaa actgataaag atgtaacttt gacttttgag 780
 gttgacggaa aagaacaaac ggtgactggt gattacttac tcgtttctgt tggacgtcgt 840
 ccaaatactg atttaatcgg cttgaacaac actgatgtta aattgactga ccgtgggttg 900
 attgaagttg acgattctta tgcaactaat gttcctcaca tttatgcaat cggatgatgtg 960
 gttcctggtc caatgctcgc tcacaaagct tctttccaag ctaaagtgc tgctgctgcg 1020
 attgctggag ctgaggacga cgtggactta cacgttgctt tgcctgctgt agcttataca 1080
 acaactgaat tagcaacagt tggagaaacg cctgaatcag ttaaagaccg taaagatggt 1140
 aaaatttcta agttccatt tgctgcaaat ggccgtgcca tttcaatgaa tgatacgact 1200
 ggtttcttac gtttgattac tgaaactaaa gaaggggcct taatcgggtgc tcaaatcgtt 1260
 ggcctggtg catctgactt gatttctggt ttatcactag cgattgaaa tggattgact 1320
 tctaagaca tttcattgac tatccaacct cacccaacac ttggtgaagc gattatggat 1380
 acagctgaat tggctgatgg cttaccaatt cacgtttaa 1419

<210> 5

<211> 1311

5 <212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 5

atgacagtaa catcagattt cacacaaaaa ctctacgaaa attttgcaga aaatacaaaa 60
 ttgcgtgctg tggaaaatgc cgtgactaaa aatgggttgc tttcatcact cgaagtccgt 120
 ggttcacatg cagcaaattt gcctgagttt tcaattgact tgacaaaaga ccctgtaacg 180
 aatcaaaaac aatctggtcg ttgctggatg tttgctgctt tgaacacttt ccgtcataaa 240

10

ES 2 735 996 T3

tttatcaatg aatttaaaac agaggatfff gagttttcac aagcttacac tttcttctgg 300
 gataaatatg aaaaatcaaa ctggttcatg gaacaaatta ttggtgatat tgaatggac 360
 gatcgtcgtt tgaattcct tttacaaaca ccacaacaag atggcggcca atgggatatg 420
 atggttgcaa tttttgaaa atatggaatt gttcccaaag ctgtttatcc tgaatcacia 480
 gcttcaagta gctcacgtga attgaaatcaa tacttgaata aactactccg tcaagatgct 540
 gaaatfffgc gttatacaat tgagcaagggt ggagatggtg aagcagttaa agaagaactt 600
 ttgcaagaag tctttaatff ccttgcggtg actttaggtt tgccaccaca aaatfffgaa 660
 tttgctttcc gtaataaaga taatgaatac aaaaaatffg ttggtagtcc aaaagaatff 720
 tacaatgaat atggtggaat tgatttgaat aattatgtgt cagtaatacaa tgctccaact 780
 gctgacaaaac cttataataa gagctacaca gttgagtttc ttggaaatgt tgcggtggt 840
 aaagaagtga aacatffgaa tgttgaaatg gaccgctffa aaaaatffgc cattgcccac 900
 atgcaagctg gtgaaacagt ttggtttggt tgtgacgtgg gtcaagaatc aaatcgttca 960
 gcaggactff tgacaatgga ttcttatgat ttcaaatctt cattggatat tgaatffact 1020
 caaagcaaaag caggacgtct tgactatggt gagtcgttga tgacgcatgc catggtffta 1080
 gcgggtggtg atfftagatgc tgacggaaat tcaactaaat ggaaagtga aaatfcattg 1140
 ggtaaagatg cgggtcaaaa aggatatfff gttgcctctg atgaatggat ggatgaatat 1200
 acttatcaaa ttggtgtccg taaagacctt ttaactgaag aagaatffgc tgcttacgaa 1260
 gagaacctc aagtacttct accatgggac ccaatgggtg ctttagctta a 1311

<210> 6

<211> 648

5 <212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 6

atgaaaaata aaatfftaga cctgagggca tatffttattg ctggcccaca agatffttcca 60
 aaactffcaa ttgatgatgc aatcgataaa atffctgtaa tcataaaaag tggagtaacg 120
 gtttatcaat ttcgtgataa gggaaacaatt tataaaaata aaaatcaacg attagaagta 180
 gcaaaaagac tacaagaagt agctcagaaa gcggctgfff cttffttattgt gaatgatgat 240
 gttgaattag cgcgtgaatt gtcagctgac gggattcatg tcggacaaga cgatgattct 300
 gtcagtaaaa ttcgtgagct gattggccaa gaaatgtggg taggactffc tgtcagtaat 360
 gatatggaat tagaaagcgc tcaaaagagt gggctgact atffgggaat tggttccaatt 420
 tatccaacaa atagcaagtc cgacgcagca gaaccaattg gggttgacca tffaagaaaa 480
 atgcttgagc ataatcaatt accaactggt ggaatffgtg gaattactga aaatfcactg 540
 acagagctff caaaaatffg tctgggtgga gttgcggtaa tttctffgct gacagaatcc 600

10

ES 2 735 996 T3

gaaaattaca aaaatatggt tcaaaaaatt aagcaaaata ttagatga 648

<210> 7

<211> 1623

5

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 7

atgaaacaac cactttataa tacaggagtt ttattttaaga ctttaataaa aagggattgg 60
 ttttaagttag ttttctggat ttttaggaatg cttgcttttg ctgcttcagg ggcagggaaa 120
 atggaagttg cctcgaatcc ggcgacggct agtactcttt atacaatgtt tgtcaaaaat 180
 ccagcaatgg tcggattatt tggaccaact ccaataaata atccaactaa ttatagtctg 240
 gggccgattt ttggtcaaac catgacttta attacggggc tgactttcgc tatcatttcg 300
 attatttatg ttgttaatcg aagcagaaaa gaagaagatg atgggattac agaacttttt 360
 cggctttact ctattggaaa attggcaaat acgactgctt tagtcatgga acttttgctc 420
 ttaaatttaa taatggctgt cttattagct ctttcaatag aggtccaaaa cgtggctggc 480
 ttgaatcatt tagaaagtaa ttttctattt gctttcacia caagcgcoca gggtttcoctt 540
 tggggaatgt ttgctttact tttcggtcaa attttctctg aagcaagtac aactaaaggg 600
 atgacatttg gtttactggg tttgttatat attgttcgaa tgctaacaga tgtaacaaat 660
 ctttccatag gttggttcaa tcctctgtct tggctttatc tagcttttcc atatgttaaa 720
 ggtcatgaaa attggttagc tgtctttttg acttttctct tagcttttct aatttttagga 780
 atatcctata ttctagagct taaaagagat gtgggagtg ggtattttcc cgaagaaag 840
 gcgcgacttc atgggaaaaa gggacatttc ggatttcctg gtctcgtttt gaatcttgaa 900
 aaaaagatga ttatcggttg gcttttggca agttttgttc tgggcttagt ttatggttca 960
 atgtttggac aatggacca atttatttca agtaataaaa ccgtaagga gctttttggt 1020
 gggaatgaaa cggcagcgag tgcgattaga gaaacttca tggctactct gttttcgata 1080
 ttgtcaatct taatcgcagc gtttgggtga attttactga caaaaatggt gagcgaggaa 1140
 agaaaaaatc gtctggaagc tctttatgct ttaccacttt cacgactaaa agtgtattcc 1200
 acttatttac tgatagctat tctgtcagta attttagctc agtttttagc gctttttgga 1260
 atattttattg aacagttggg taataaaaaat gctttgagct tcttagaaat tatgaaatct 1320
 ggcgatgattt ggcttggtgc tgcataattt gttttagcaa tacttagtct gttacttggg 1380
 cttgtgcctc gtttggcaga attaatttgg gtatatcttg ctttcttact ttttatgact 1440
 tatcttggaa aattattatc tttgccaaaa tggcttgaaa atttaagcat ttataactat 1500
 attcctaaat tgccagttga gaaaatgaat cttcctaccg ttttattcat attaatttta 1560
 tctgtcttct tagttttact tggcttttga gcttatagaa gacgcgattt aatcacgggg 1620

10

ES 2 735 996 T3

taa

1623

<210> 8

<211> 1116

5

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 8

```

atggctttaa cagcaggtat cgttggttta ccaaacgttg gtaaatcaac tctttttaat    60
gcaattacaa aagcagggcg agaagctgca aactatcctt ttgcaacaat tgaccctaat    120
gttgggatgg tagaagtacc ggatgaacgt ttaaacaagt taacagagtt gattaaacct    180
aagaaaactg ttccgacaac ttttgaattt acagatattg ctgggattgt taaaggggct    240
tcacgcgag aaggtctagg aaataaattt cttgccataa ttcgtgaagt agatgccatc    300
attcacggtt ttcgagcttt tgatgatgaa aatgtaatgc gtgaaaataa ttcgtgaagat    360
gcttttattg atccaatggc agacattgaa acaattaatc ttgaattaat tttggccgat    420
ttagaatcag tcaataaacg ttatgcgctg gttgaaaaag ttgctcgtac ggcaaaagat    480
aaagatgctg tcgcagaatt taatgttttg aaaaagctca aaccggtact tgaagatggt    540
aatcagcac gaacaattga ctttgacgaa gatgaaataa aggttcttaa aagcttgctc    600
ttattgacaa gtaaaccagt tctttatgta gctaattgtt cagaagatga agtaggcgaa    660
cctgataata tcgaatacgt gaaacaaatt cgtgagtttg cggcgactga aaatgctgaa    720
gttgctgtga tttctgctcg tgttgaagaa gaaatctcag agttggaaga tgatgaaaaa    780
gcagaatttt tggaagcaat tggcttaaaa gaatctgggt ttgatatggt gactcgtgca    840
gcttaccacc ttcttgact tgccacttac tttactgctg gtgaaaaaga agtccgtgct    900
tggaccttca agcgtggaat gaaagctcca caaatggcag gaattattca tacagacttt    960
gaaaaaggct ttatccgctc agtaactatg tcttatgatg atttgcttaa atacggttca   1020
gaaaaagctg ttcgtgaagc cggctcgttg cgtgaagaag gaaaagaata tgttggtcaa   1080
gatggcgaca ttatggaatt ccgtttcaac gtgtaa                               1116

```

10

<210> 9

<211> 411

<212> ADN

15

<213> Lactococcus lactis

<400> 9

ES 2 735 996 T3

```

atggatcggt atactaaaa agtcattgct tgggatttag gaaagcgaat gactctagaa      60
ttagtgcaaa ggactttgaa taaggcaatg gaatcacaaa attatccaga agctgtgatg      120
cttcattctg accaaggaag tcagtatacg agtcatgagt atgaagagac aataaaaaac      180
tctggaatga ctcaactcctt cagtcgtaag ggtatcctt atcataatgc cagtcttgaa      240
tcttggcatg gacatttaaa aagagagtgg gtgtatcaat ttaaataaa gaactttgaa      300
gaagcctatc agagtatctt ctggtacatc gaagcctttt ataattcaa acgaatccat      360
caaagtttag ggtatcttac gcctaataca tttgaaaaag aaatcactta a              411

```

<210> 10

5

<211> 645

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 10

10

```

atgataagaa gtgaatgtct caaattaaaa aatagcttag ggttttattt agtttttctc      60
tttactttat tagagctttt aacggttcct atttatttag cttttggaag aagtcatggt      120
tcaatgactg atttatcgct catgattttt ttgttttttc cgttactggt tacaattttg      180
tctattctaa tctttgaaca ggagagtctg gccaatcgtt tccaagaaat aaatgtaaat      240
aaaaaaagta gcagaatttg gttatcaaag ctaatagtag tggatttcct tttgttcttt      300
ccatcagcaa tgatctggat aattacggga gtttcacagg cagtagggca acaaggaatg      360
atgatcgcaa cagctagctg gttgatggca atttttctta atcattttca tcttttattg      420
acctttataa tcaatcgagg agggagcatg attatcgcca ttattgaaat attactcatt      480
atttttgcc a gtaataaagt tttattagca gcttattggt gtccattgca tttacctggt      540
aattttatga taactgggag gtgtgcttat ctgatagctg ccgtaggggtg gattgtttta      600
tccacaataa ttcttgtagc attatctaaa aaaaagatta gataa                    645

```

<210> 11

<211> 729

15

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 11

ES 2 735 996 T3

atgaaaagaa taatagcatc agaagcaata aaattaaaaa aatcaggaac tcttagattg 60
 gtattaatta tcccttttgt gactctatct atagcatttc ttatgggtgg aatacagatt 120
 tttagtgttt tttcaattta ttggtgggaa actgggtttt tattcctttt gatgagtttg 180
 ctttttcttt atgatataaa atcagaggag caagctggaa attttcaaaa tgtgaaatgg 240
 aaaaagctga gttggaaaat tcatttggcc aaaatgttgt tgatttggct aagaggtata 300
 cttagcgagca tagtcttgat tttttgctt tttttggtt cttttgtgtt tcaaggtatt 360
 gtagtgggtg attttatgaa agtaagtgtg gcattgattg ctatattact agcagcttct 420
 tggaaatttac cctttatata cttgatttcc aagtggatta atacttacgt attgttagct 480
 gcgaatacct tgatttgttt aattgttgcc ccttttggtg cacaaactcc agtatggttc 540
 ttgctacat acacttatca ctataaagtt acagaaagtt tgttaaatat caaacatca 600
 ggagatttgt taacagggaa gataaatttc agtatttggg aagttttatt accatttggg 660
 ctttccatag ttgtaacgat aggagtctcg tatttactta aaggagtgat agaacatgat 720
 aagaagtga 729

<210> 12

5 <211> 678

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 12

10

atgcaggtaa aaattcaaaa tctttctaaa acatataaag aaaagcaggt gctacaagat 60
 atcagttttg atattaaatc tggaaacagtc tgtggtttat taggagttaa cgggtcagga 120
 aaatcaactt tgatgaaaat tttgtttggt ttaatttctg cagatactgg aaaaattttt 180
 tttgatggac aagaaaagac aaataatcaa ctggagcct taatcgaggc tccagcaata 240
 tatatgaatt tatctgcttt cgataatcct aaaactaagg ctttgctttt tggaaattca 300
 gataagagaa ttcatgaaac tctagaagtg attggttttg cagaaacagg aaagaaaaga 360
 gcaggaaaat tctcttttagg gatgaaacaa cgtttgggaa ttggtatggc tattcttaca 420
 gaacctcaat ttttaattct tgatgaacct actaatggtt tggatcctga tggatttgcg 480
 gagttgtaa acttaatctt aaaacttaaa gctaaagggtg tgacaatctt gatttctagt 540
 catcagttgc acgaaataag taaagtagct agtcaaatta ttattttgaa caaaggtaag 600
 attcgttata atcgtgcgaa caataaagaa gacgacattg aacagttatt cttaagatt 660
 gtgcatggag gaatgtga 678

<210> 13

<211> 687

ES 2 735 996 T3

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 13

5

```
gtgtataaaa ttttaatagt tgatgatgat caggaaattt taaaattaat gaagacagca      60
ttagaaatga gaaactatga agttgcgacg catcaaaaca tttcacttcc cttggatatt     120
actgattttc agggatttga tttgattttg ttagatatca tgatgtcaaa tattgaaggg     180
acagaaattt gtaaaaggat tcgcagagaa atatcaactc caattatctt tgttagtgcg     240
aaagatacag aagaggatat tataaacggc ttaggtattg gtggggatga ctatattact     300
aagcctttta gccttaaca gttggttga aaagtggaag caaatataaa gcgagaggaa     360
cgcaataaac atgcagttca tgttttttca gagattcgta gagatttagg accaattaca     420
ttttatttag aagaaaggcg agtctgtgtc aatgggtcaaa caattccact gacttgtcgt     480
gaatacgata ttcttgaatt actatcacia cgaacttcta aagtttatac gagagaggat     540
atztatgatg acgtatatga tgaatattct aatgcacttt ttcggtcaat ctcggagtat     600
atztatcaga ttaggagtaa gtttgaccca tacgatatta atccgataaa aacggttcgg     660
ggacttgggt atcagtggca tgggtaa                                           687
```

<210> 14

10

<211> 1344

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 14

15

ES 2 735 996 T3

atgggtaaaa aatattcaat gcgtcgacgg atatggcaag ctgtcattga aattatcata 60
 ggtacttgtc tacttatcct gttgttactg ggcttgactt tctttctacg acaaattgga 120
 caaatcagtg gttcagaaac tattcgttta tcttttagatt cagataatth aactatthct 180
 gatatcgaac gtgatatgaa aactaccoca tatgattata ttatthtttga caatgatata 240
 agtaaaatth tgggaggaca ttatgtcaag tcggatgtac ctatthtttgt agcttcaaaa 300
 cagtcttcac ataatattac agaaggagaa attacttata cttattcaag caataagcat 360
 thttcagttg thtttaagaca aaacagtatg cctgaatthta caaatcatac gcttcgthca 420
 atthcttata atcaatthac ttacctthtc thttthcttg gtgaaataat actcattatt 480
 thttctgtct atcatctcat tagagaatth tctaagaatt thcaagccgt tcaaaagatt 540
 gcattgaaga tgggggaaat aactacttht cctgaacaag aggaatcaaa aattattgaa 600
 thtgatcagg thctgaataa cttatattcg aaaagtaagg agthtagctth ccttattgaa 660
 gcggagcgtc atgaaaaaca tgatthtacc thccaggttg ctgcactthc acatgatgth 720
 aagacacctt taacagtatt aaaaggaaat attgaactgc tagagatgac tgaagtaaat 780
 gaacaacaag ctgattthtatt tgagtcaatg aaaaatagth tgactgthtt tgacaagtat 840
 thtaacacaa tgattagtta tacaaaactt thgaatgatg aaaatgatta caaaagcaca 900
 atctccctgg aggattthtt gatagattta tcagthttagt tggaagagth gtcaacaact 960
 tatcaagtgg attatcagct agthtaaaaa acagattthaa ccactthtta cggaataata 1020
 thtagctthta gtcgagcact tatcaatacc thtgthtaatg cctgtcagta tgctaaagag 1080
 ggtgaaaaaa tagtcagtht gagtatttht gatgatgaaa aatattctcta thttgaaatc 1140
 tggaataatg gtcaccttht thctgaacaa gcaaaaaaaa atgctggaaa actatthttc 1200
 acagaagata ctggacgtag tgggaaacac tatgggattg gactatctth tgctcaaggt 1260
 gtagctthta aacatcaagg aaacttaatt cttagtaatc ctcaaaaagg tggggcagaa 1320
 gttatcctaa aaataaaaaa gtaa 1344

<210> 15

<211> 2010

5

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 15

ES 2 735 996 T3

ttgggtttat cagcaactgt gcatggggag acaacaaatt cacaacagtt actetcaa	60
aatattaata cggaaattaat taatcataat tctaatagcaa tttatcttc aacagagga	120
tcaacgactg attcgattaa tctagggcg cagtcacctg cagtaaaatc gacaacaag	180
actgaattgg atgtaactgg tgctgctaaa actttattac agacatcagc tgttcaaaaa	240
gaaatgaaag tttcgttgca agaaactcaa gttagttctg aattcagtaa gagagatagc	300
gttacaaata aagaagcagt tccagtatct aaggatgagc tacttgagca aagtgaagta	360
gtcgtttcaa catcatcgat tcaaaaaaat aaaatcctcg ataataagaa gaaaagagct	420
aacttcgtta ctctctctcc gcttattaag gaaaaacat caaattctaa agatgcatct	480
ggtgtaattg ataattctgc ttctctcta tcttatcgta aagctaagga agtggtatct	540
cttagacaac ctttaaaaa tcaaaaagta gaggcacaac ctctattgat aagtaattct	600
tctgaaaaga aagcaagtgt ttatacaaat tcacatgatt tttgggatta tcagtgggat	660
atgaaatatg tgacaaataa tggagaaagc tatgctctct accagccctc aaagaaaatt	720
tctgttgtaa ttattgatc aggaatcatg gaagaacatc ctgatttgtc aaatagttta	780
ggaaattatt ttaaaaatct tgttcctaag ggagggttg ataataaga acctgatgaa	840
actggaatc caagtgatat tgcgacaaa atgggacacg ggacggaagt cgcaggtcag	900
attacagcaa atggtaatat tttaggagta gcaccaggga ttactgtaa tatatacaga	960
gtatttggtg aaaatcttcc gaaatcggaa tgggtagcta gagcaataag aagagctgcg	1020
gatgatggga acaaggcat caatataagt gctggacagt atcttatgat ttcaggatcg	1080
tatgatgatg gaacaaatga ttatcaagag tatcttaatt ataagtcagc aataaattat	1140
gcaacagcaa aaggaagtat tgttgcgca gctcttgta atgatagttt aaacatacaa	1200
gataaccaa caatgataaa ctttcttaag cgttcagaa gtataaagg tcttgaaaa	1260
gttgtagatg caccgagtgt atttgaggat gtaatagccg taggtggaat agatggttat	1320
ggtaatattt ctgattttag taatattgga gcggatgcaa tttatgctcc tgctggcaca	1380
acggccaatt ttaaaaaata tgggcaagat aaatttgtca gtcagggtta ttattgaaa	1440
gattggcttt ttacaactac taatactggc tggtagcaat atgtttatgg caactcattt	1500
gctactccta aagtatctgg ggcactggca ttagtagttg ataaataggg aataaagaat	1560
cctaaccaac taaaaagggt tcttctaatag aattctccag aagttaatgg gaatagagta	1620
ttgaatattg ttgatttatt gaatgggaaa aataaagctt ttagcttaga tacagataaa	1680
ggtcaggatg atgctattaa acataaatcg atggagaatc ttaaagagtc tagggataca	1740
atgaaacagg aacaagataa agaaattcaa agaaatacaa ataacaattt ttctatcaaa	1800
aatgatttcc ataacatttc aaaagaagta atttcagttg attataatat taatcaaaaa	1860
atggctaata atcgaaatc gagaggtgct gttctgtac gaagtcaaga aattttacct	1920
gttactggag atggagaaga tttttaccg gctttaggta tagtgtgtat ctcaatcctt	1980
ggtatattga aaagaagac taaaaattga	2010

<210> 16

5 <211> 738

<212> ADN

ES 2 735 996 T3

<213> Lactococcus lactis

<400> 16

atgagaagat atttaatact tattgtggcc ttaataggga taacaggttt atcaggggtg	60
tatcaaacaa gtcataaaaa ggtgagggtt gacgaaggaa gttatactaa ttttatttat	120
gataataaat cgtatttcgt aactgataag gagattcctc aggagaacgt taacaattcc	180
aaagtaaaat tttataagct gttgattggt gacatgaaaa gtgagaaact tttatcaagt	240
agcaacaaaa atagtgtgac tttggtctta aataatattt atgaggcttc tgacaagtcg	300
ctatgtatgg gtattaacga cagatactat aagatacttc cagaaagtga taagggggcg	360
gtcaaagctt tgagattaca aaactttgat gtgacaagcg atatttctga tgataatttt	420
gttattgata aaaatgattc acgaaaaatt gactatatgg gaaatattta cagtatatcg	480
gacaccaccg tatctgatga agaattggga gaatatcagg atgttttagc tgaagtacgt	540
gtgtttgatt cagttagtgg caaaagtatc cagaggtctg aatgggggag aattgataag	600
gatggttcaa attcacaaca gagtaggacg gaatgggatt atggcgaaat ccattctatt	660
agaggaaaat ctcttactga agcatttgcc gttgagataa atgatgattt taagcttgca	720
5 acgaaggtag gaaactag	738

<210> 17

<211> 1245

<212> ADN

10 <213> Lactococcus lactis

<400> 17

atgaataaaa aaaatataaa aagaaatggt gaaaaatta ttgctcaatg ggatgagaga	60
actagaaaaa ataaagaaaa cttcgatttc ggagagttga ctctctctac aggattgcct	120
ggtataattt taatgtttagc ggagttaaaa aataaagata actcaaagat atatcagaaa	180
aagatagaca attatattga atatatggtt agcaaaacttt caacatatgg gcttttaaca	240
ggatcacttt attcgggagc agctggcatt gcattaagta toctacattt acgagaagat	300
gacgaaaaat ataagaatct tcttgatagc ctaaatagat atatcgaata tttcgtcaga	360
gaaaaaattg aaggatttaa tttgaaaaac attactcctc ctgattatga cgtgattgaa	420
ggtttatctg ggatactttc ctatctatta ttaatcaacg acgagcaata tgatgatttg	480
aaaatactca ttatcaattt tttatcaaat ctgactaaag aaaacaatgg actaatatcg	540

ES 2 735 996 T3

ctttacatca aatcggagaa tcagatgtct caatcagaaa gtgagatgta tccactaggc 600
 tgtttgaata tgggattagc acatggactt gctggagtgg gctgtatctt agcttatgcc 660
 cacataaaag gatatagtaa tgaagcctcg ttgtcagctt tgcaaaaaat tatttttatt 720
 tatgaaaagt ttgaacttga aaggaaaaaa cagtttctat ggaaagatgg acttgtagca 780
 gatgaattaa aaaaagagaa agtaattagg gaagcaagtt tcattagaga tgcatggtgc 840
 tatggagggtc caggatttag tctgctatac ttatacggag gattagcact ggataatgac 900
 tattttgtag ataaagcaga aaaaatatta gagtcagcta tgcaaaggaa acttggatt 960
 gattcatata tgatttgcca tggctattct ggtttaatag aaatttgttc tttatttaag 1020
 cggctattaa atacaaaaaa gtttgattca tacatggaag aatttaagt taatagtgag 1080
 caaattcttg aagaatacgg agatgaaagt ggcacgggtt ttcttgaagg aataagtggc 1140
 tgtatactgg tattatcgaa atttgaatat tcaatcaatt ttacttattg gagacaagca 1200
 cttttacttt ttgacgattt tttgaaagga gggaagagga aatga 1245

<210> 18

<211> 1803

5

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 18

atggatgaag tgaaagaatt cacatcaaaa caatttttta atactttact tactcttcca 60
 agcaccttga agttaatttt tcagttggaa aaacgttatg caatttattt aattgtgcta 120
 aatgctatca cagcttttgt tccgttggct agtcttttta tttatcaaga ttttaataaac 180
 tctgtgctag gttcaggag acatcttatac aatattatta tcatctattt tattgttcaa 240
 gtgataacaa cagttctggg acagctggaa agttatgta gtggaaaatt tgatatgcca 300
 ctttcttaca gtatcaatat ggcctcatg aggactacct catctcttga attaagtgat 360
 tatgagcagg ctgatatgta taatatcata gaaaaagtta ctcaagacag cacttacaag 420
 ccttttcagc tatttaatgc tatcattggt gtgctttcat cgtttatctc attgttatct 480
 agtctatttt ttattggaac atggaacatt ggggtagcaa ttttactcct tattgttcca 540
 gtattatctt tggfactttt tctcagagtg ggacaattag agtttttaac ccagtggcag 600
 agagcaagtt ctgaaagaga aacatggtat attgtatatt tattgactca tgatttttca 660
 tttaaagaaa tcaagttaaa taatattagc aattacttca ttcataaatt tggaaaatta 720
 aagaaggat ttatcaacca agatttagct attgctcgta agaagacata tttcaatatt 780
 tttcttgatt tcattttgaa tttgataaat attcttacga tatttgctat gatcctttcg 840
 gtaagagcag gaaaacttct tataggtaat ttggtaagtc tcatacaagc tatttctaaa 900
 atcaatactt attctcaaac aatgattcaa aatatttaca tcatttataa tactagtttg 960

10

ES 2 735 996 T3

tttatggaac aactttttga gtttttaag agagaaagtg tagttcacia aaaaatagaa 1020
 gatactgaaa tatgcaatca acatatagga actgttaaag taattaatth atcatatgth 1080
 tacctaatt cgaatgcctt tgcactaaag aatatcaatt tacccttga aaaaggagaa 1140
 ttaactgcta ttgtaggaaa aaatggttca gggaaaagta cactagtaaa gataatthca 1200
 ggattatath aaccaactat ggggaataath caatacgaca aaatgagaag tagthttgatg 1260
 cctgaggagt tttatcagaa aaacathatcg gtgctgttcc aagaththgt gaagtatgag 1320
 ttaacgataa gagagaathat aggattgagt gaththgtctt ctcaatggga agatgagaaa 1380
 attathaaag tactagataa tttaggactc gathththtga aaactaataa tcaathatgta 1440
 cthgathatcg agthtaggaaa ttggtthcaa gaagggcatc aactthtcagg aggtcagthg 1500
 caaaaaattg cattagcaag gacathctth aagaaagctt caaththath tthgatgaa 1560
 ccaagtgtcg cactcgathc tgtagctgaa aaagaaathat ttgaththtt thgtgtctt 1620
 tchgaaaaata athththcaath ththctthct catagththga atgctgccag aaaagcaath 1680
 aaaaatcgthg thathgaaaga tggacaggtc gaagatgthg gaagthcatga thctctctcg 1740
 agaagatgthc aathactathc agaactthth ththcagagc aathatgagga thathgatgaa 1800
 thaa 1803

<210> 19

<211> 2982

5

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 19

atgataaaaa gthcaththaa agctcaaccg thththtagthaa gaaathacaath thththctcca 60
 aacgataaac ggagthththac tgaathathact caagthcathg agactgthaa gaaaaataaa 120
 gththththtg aacagththact actagcthaath ccthaaactct atgathgthth gcagaaathat 180
 aathgctggthc thgtthaaagaa gaaaagggth aaaaaathth thgathctath ththcaagthth 240
 ththaaagagaa gththththacg athcaactcca ththggathth ththgthgaaac ththcaathggth 300
 gththththcga aaagththcaca ththcaagthth atgggaaaga ctacaaaggg ththaaagathg 360
 gathactcagth ggthgaththc cctagththcat aaaaatgthaa gathththctc aaaaaagthth 420
 thcathththacta gaaathathgc aathththaa gththggagathc gaththththca agthththathc 480
 athaaathagth gthgagctthga agagththaaath aththaaathata cgaathgthth ththcaaththth 540
 thctgaththth gthgagaththc ctathcaaaaa ththgagathata ththgthgaaac thththaacgctth 600
 thgctathggag acgaththathg agathctathc gaaathathc ththgthgthct gathgththath 660
 caththththga thctthathth acaaaaaagath ththgthgthcag athththctthg gaathctthth 720
 thgacthaag ththgagcaath agathgagath aaaaaathata thththctctc gaaaaagthth 780

10

ES 2 735 996 T3

caaaagttta ttcaagaata ctcaagaata gaaattggtg aaggtattga gaaactgaaa 840
 gaaatatatc aggaaatgtc acaaattcctt gagaatgata attatattca aattgattta 900
 attagtgata gtgaaataaa ttttgatggtt aaacaaaagc aacaattaga acatttagct 960
 gagtttttag gaaatacgc aaaatctgta agaagaacat attggatga ctataaggat 1020
 aaatttatcg aaaaatatgg tgtagatcaa gaagtacaaa taacagaatt attgattct 1080
 acatttgga taggagctcc atataattat aatcatcctc gaaatgactt ttatgagctc 1140
 gaaccgagta ctctatacta ttcagaagag gagagagaaa agtacctcag catgtatgta 1200
 gaagccgta aaaatcataa tgtaattaat cttgacgact tagagtctca ttatcaaaaa 1260
 atggacttag aaaagaaaag tgaacttcaa gggttagaat ttttttgaa tttggcaag 1320
 gagtatgaaa aagatatttt ttttttaggg gatatcgttg gaaataataa tttgggagg 1380
 gcatcagga gatctctcgc actctctccg gagttaacaa gttatcatag aacgatagta 1440
 gattctgtcg aaagagaaaa tgagaataaa gaaattacat cgtgtgaaat agtatttctt 1500
 ccagaaaaa tcagacatgc taacgttatg catacatcaa ttatgaggag gaaagtactt 1560
 ccatttttta caagtacaag tcacaatgaa gttctgttaa ctaatatcta tattggaata 1620
 gacgaaaaag aaaaatttta tgcacgagac atttcaactc aagaggtatt gaaattctac 1680
 attacaagca tgtacaataa aacgttattc agtaatgagc taagatttct ttacgaaatt 1740
 tcattagatg acaagtttg taatttacct tgggaactta tttacagaga ctttgattat 1800
 attccacggt tagtatttga cgaaatagta atatctcctg ctaaaggaa aatttgggga 1860
 agggatgtaa atagtaagat gacaataaga gaacttattc aaagcaaaga aattcccaaa 1920
 gagttttata ttgtcaatgg agataataaa gtttatttat cacaggaaaa cccattggat 1980
 atggaaattt tagagtcggc gataaagaag agctcaaaaa gaaaagattt tatagagcta 2040
 caagaatatt ttgaagatga aaatatcata aataaaggag aaaaggggag agttgccgat 2100
 gttgtagtgc cttttattag aacgagagca ttaggtaatg aagggagagc atttataaga 2160
 gagaaaagag tttcggttga acggcgtgaa aaattgccct ttaacgagtg gctttatcta 2220
 aagttgtaca tttctataaa tcgtcaaaat gaatttttac tgtcgtatct tccagatatt 2280
 cagaaaatag tagcaaacct gggtggaat ctattcttcc taagatatac tgatcctaaa 2340
 ccacatatta gattgcgtat aaaaatttca gatttatttt tagettacgg atctattctt 2400
 gaaatcttaa aaaggagtcg gaaaaatagg ataatgtcaa ctttgatat ttctatttat 2460
 gatcaagaag tagaaagata tgggtgattt gatactttag agttatccga agcaatatt 2520
 tgtgccgatt ctaaaattat tccaaatttg cttacattga taaaagatac taataatgat 2580
 tggaaaagtc atgatgtatc aatcttggtg aattatttat atctgaaatg cttctttcag 2640
 aatgataaca aaaagattct taattttttg aatttagtta gtcctaaaaa ggttaaagaa 2700
 aatgtcaatg aaaagattga acattatctt aagcttctga aagttaataa tctaggtgac 2760
 caaatttttt atgacaagaa ttttaagaa ttaaagcatg ccataaaaaa tttattttta 2820
 aaaatgatag ctcaagattt tgaacttcag aaagtttatt caattattga cagtatcatt 2880
 catgtccata ataaccgact aattggattt gaacgagata aagagaaatt aatttattac 2940
 acacttcaaa ggttgtttgt ttcggaagaa tacatgaaat ga 2982

ES 2 735 996 T3

<210> 20

<211> 57

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

5

<400> 20

Met	Ser	Thr	Lys	Asp	Phe	Asn	Leu	Asp	Leu	Val	Ser	Val	Ser	Lys	Lys
1				5				10						15	
Asp	Ser	Gly	Ala	Ser	Pro	Arg	Ile	Thr	Ser	Ile	Ser	Leu	Cys	Thr	Pro
			20					25					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									

10

<210> 21

<211> 318

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

15

<400> 21

atgaatgatt	tat	ttttatca	tcggctaaag	gaactagttg	aatcaagtgg	taa	atctgca	60
aatcaaatag	aaaggaatt	gggttaccct	agaaattcct	tgaataatta	taagttggga			120
ggagaaccct	ctgggacaag	attaatagga	ctatcagagt	attttaatgt	gtctccaaaa			180
tatctgatgg	gtataattga	tgagccta	atgacagttctg	caattaatct	ttttaaact			240
ctaactcaag	aagagaaaa	agaaatg	tttataatgtgc	aaaaatggct	tttttagaa			300
tatcaaatag	agttataa							318

<210> 22

20

<211> 768

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 22

25

ES 2 735 996 T3

atgatgaaaa aaggaatfff tgtaattact atagtgatat ctatagcatt gataattgga 60
 ggtttttata gttataattc taggataaat aatctttcaa aagctgataa aggaaaagaa 120
 gttgtaaaaa atagcagtga aaaaaatcag atagacctta cctataaaaa gtattataaa 180
 aatttaccaa aatcagttca aaataaaata gatgatattt catccaaaaa taaagaagtt 240
 actttaactt gtatttgcca atctgattca gttatttctg aacaatttca acaaaactta 300
 caaaaatatt atggaaataa gttttggaac atcaaaaata tcaacttaca tggcgaact 360
 agtgaacaat tattggctga aaaagttgaa aaccaagtat tagccactaa tcctgatggt 420
 gttttatatg aagctccact ttttaatgat aaccaaaaca ttgaagcaac agcctcactg 480
 actagtaatg agcaacttat aacaaatttg gctagtgcag gagcggaggt aatagttcaa 540
 ccctctccac cgatttatgg tgggtgtgtg taccocgtac aagaagaaca gtttaacaa 600
 tctttatcta caaagtatcc ctatatagac tactgggcta gttaccaga caaaaattct 660
 gatgaaatga aggggctggt ttctgatgat ggagtatata gaacattaaa tgcttcgggg 720
 aataaggttt ggctagatta tattactaaa tttttacag caaactaa 768

<210> 23

5

<211> 780

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 23

10

atgcaggaaa cacaggaaca gacgattgat ttaagagggg tttttaaaat tattcgcaaa 60
 aggttagggt taatattatt tagtgcttta atagtcaaaa tattagggag catctacaca 120
 ttttttatag cctccccagt ttacacagcc tcaactcaac ttgtcgtaa actaccaaat 180
 tcggataatt cagcagccta cgctggaaa gtgaccggga atattcaaat ggcaacaca 240
 attaaccaag ttattgtag tccagtcatt ttagataaag ttcaaagtaa tttaaactta 300
 tctgatgact ctttcaaaa acaagttaca gcagcaaatc aaacaaattc acaagttatt 360
 acgcttactg ttaaattatc taatccttac attgcacaaa agattgcaga cgagactgct 420
 aaaatattta gttcagacgc accgaaacta ttgaatgta ctaacgtaa tattctatcc 480
 aaagcaaaag ctcaacaac accaattagt cctaaaccta aattgtattt agcgatatct 540
 gttatagtcg gactagtttt aggtttagcc attgctttat tgaaagaatt gtttgataac 600
 aaaattaata aagaagaaga tattgaagct ctggggctca cggttcttgg tgtaacaacc 660
 tatgctcaaa tgagtgattt taataagaat acaataaaa atggcacgca atcggaact 720
 aagtcaagtc cgcttagcga ccatgaagta aatagatcat caaaaaggaa taaaagatag 780

<210> 24

ES 2 735 996 T3

<211> 696

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

5 <400> 24

```
atggctaaaa ataaaagaag catagacaac aatcggtata ttattaccag tgtcaatcct      60
caatcaccta tttctgaaca atatcgtagc attcgtacga ccattgattt taaaatggcg      120
gatcaaggga ttaaaagttt tctagtaaca tcttcagaag cagctgcagg taaatcaacc      180
gcgagtgcta atatagctgt tgcttttgca caacaaggta aaaaagtact ttttaattgat      240
ggtgatcttc gtaaaccgac tgttaacatt acttttaag taaaaatag agtagggta      300
accaatattt taatgcatca atcttcgatt gaagatgcca tacaaggac aagactttct      360
gaaaatctta caataattac ctctgggtcca attccaccta atccatcgga attattagca      420
tctagtgcaa tgaagaattt gattgactct gtgtccgatt tctttgatgt tgttttgatt      480
gatactccac ctctctctgc agttactgat gctcaaattt tgagtagtta tgtaggagga      540
gtggttcttg ttgtacgtgc ctatgaaaca aaaaaagaga gtttagcaaa aacaaaaaaaa      600
atgctggaac aagttaatgc aaatatttta ggagttgttt tgcattgggt agactcttct      660
gactcaccgt cgtattacta ctacggagta gagtaa      696
```

<210> 25

10 <211> 687

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 25

15

ES 2 735 996 T3

atggaatfff ttgaggatgc ctcatcacct gaatcggaag agcctaagtt agtagaatta 60
 aaaaatffff cttatagaga gctaattata aaaagagcaa ttgatatcct aggaggatta 120
 gcaggttcag ttttatttct tattgcggct gcattgcttt atgtgcctta caaaatgagc 180
 tcaaaaaaag atcaagggcc aatgttctat aaacaaaaac ggtatggaaa aaacggtaaa 240
 attttttata ttttgaaatt tagaacaatg attcttaatg cggagcagta tctagaactt 300
 aatccagatg ttaaagctgc ttaccatgcc aacggcaata agctagaaaa cgatccacgg 360
 gtaacgaaga ttggctcatt tataagacga cactcaattg atgaactgcc acaatttatac 420
 aatgttctta aaggggatat ggcatgggtt ggcccaagac caattttgct ttttgaagcg 480
 aaagaatatg gggagcgcct ctcttactta ctcatgtgta aacctggaat tactggttat 540
 tggacaacac atggtcgaag taaagttott tttcctcaac gagcagattt agaactotat 600
 tacctccagt accatagtac caaaaacgat atcaagcttc tagtactcac aattgtacaa 660
 agtattaacg gatcggacgc atattaa 687

<210> 26

<211> 765

5

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 26

10

atgattgata ttcattgcca tattttaccg ggtatagatg atggagctaa aacttctgga 60
 gatactctga caatgctgaa atcagcaatt gatgaagga taacaactat cactgctact 120
 cctcatcata atcctcaatt taataatgaa tcaccactta ttttgaaaa agttaaggaa 180
 gttcaaaata tcattgacga acatcaatta ccaattgaag ttttaccggg acaagagggtg 240
 agaatatatg gtgatttatt aaaagaatff tctgaaggaa agttactgac agcagcgggc 300
 acttcaagtt atatattgat tgaatttoca tcaaatcatg tgccagctta tgctaaagaa 360
 cttttttata atattcaatt ggagggactt caacctatff tgggtccacc tgagcgtaat 420
 agcggaatca ttgagaacc tgatatatta tttgatttta ttgaacaagg agtactaagt 480
 cagataacag cttcaagtgt cactggtcat tttggtaaaa aaatacaaaa gctgtcattt 540
 aaaatgatag aaaaccatct tacgcattff gttgcatcag atgcgcataa tgtgacgtca 600
 cgtgcattta agatgaagga agcgtttgaa attattgaag atagttatgg ttctgatgta 660
 tcacgaatgt ttcaaaataa tgcagagtca gtgattttaa acgaaagttt ttatcaagaa 720
 aaaccaacaa agatcaaaac aaagaaatff ttaggattat tttaa 765

<210> 27

<211> 450

ES 2 735 996 T3

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 27

5

```

atgaaaatag cattagtagg ttccagcggg gcccatttga cacacctgta tttgttaaaa      60
aagttttggg aaaacgaaga tagattttgg gtcacatttg ataaagcaga tgcaaaatct      120
atattgaaag aagaaagatt ttatccttgt tattatccca caaatagaaa tgtaaaaaaac      180
acgataaaaa ataccattct tgcatttaaa atacttagaa aagaaaaacc agatttgatt      240
atttcgagtg gtgctgcggt agccgttctt tttttttggt taggtaaact attcggtgca      300
aagacagtct atattgaaat atttgaccgg atcgataaac caaccttaac aggaaaatta      360
gtttatccag ttactgataa gtttatagtt caatgggaag agttaaaaaa agtttacctt      420
aaagcaatta atttaggagg aattttctaa      450
    
```

<210> 28

<211> 507

10

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 28

15

```

atgatttttg taacggttgg aactcacgaa caaccattta atcgactcat tcaaaaaatt      60
gatgaacttg tacgcgatgg tgaaatcgaa gacgatgtat tcatgcaaat tgggtactca      120
acttatgaac ccaaataaac taaatgggaa aaggttattg gatatgagac tatggaaaga      180
tgtatgaatg aagcgagtac gattattact catggcggac catctaccta tatgcaagta      240
ttacaactag gtaaaattcc gatagttggt ccacggcaaa tgaaatttga tgagcatata      300
aatgatcatc aaatttgggt aagtaaacag gttgtgaaaa agggatactc attgattttg      360
tgcaagatg ttgaagacat tctcgaaaat attattagct ccaaaatttc agatacctta      420
caaaaaaatg taaatcacia cactgaattc ataaaattat tcagtgtctga aatttaccag      480
ctatttataa aaagtggaga gatatga      507
    
```

<210> 29

<211> 987

20

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

ES 2 735 996 T3

<400> 29

```

atggttaaat tttctataat tattccagta tataacttag aagattattt atatcgctgt      60
ttagaatctg ttctcaatca agattataat gattttgaga ttatacttat taatgatggt      120
tcagatgata attcacttaa tattatcgaa gaatttaaaa atcaatattc tagtaaaata      180
aaagtaattt ctcaagtgaa tcaaggagta tcatcagcaa gaaataaggg acttcaagaa      240
gctgaagggg agtatataat ttttatagat ggggatgact acattgatag taatcattta      300
agtaatattc ttgaatataat aggaaaatca aaaaattcct ttattctaaa tagtctattt      360
gtagagaccg gggaaactac ttgggttatt cccaaagcaa gtaagaatta tgattgtagt      420
ttttatggaa ctcttatgaa tattttagat aatcatagat atcaaggctt tttgtttaat      480
aaaaatttta gtaattcagt aataaaaagt aatgaattga agtttaaaga aaatttatat      540
tatgcggaag atacggagtt tgttattoga taccttttgg agttgcaaaa gagagaatcg      600
gatttagttg ctaatataat taattctcca acatatcatt atgttcaaat aaaaagtagt      660
gctactcacc aatttaatat cagacaattt tctctagtaa attctatgga ggaaattcaa      720
tgtaatctag aaaaaatgaa atcaataaat aaagaagttt tgtatgtagt acaatcaaat      780
ttaattcagt cagtattgaa aatgataaga ttatctagaa taaatggtgt agttaatgaa      840
catttggaag attcattaga taaaatcgta acaaattcat gggataatat tgaaactatc      900
tggaatctc aaagaaagat ttactctaag gtatttttaa cactaagaat tattcaggaa      960
aaagttaagg gtaagaaaat caaatag                                          987

```

- 5 <210> 30
- <211> 867
- <212> ADN
- <213> Lactococcus lactis

10 <400> 30

```

gtgataatta tacctatctt aatttttatt acccttatag gagcaggggc ttatgcctta      60
agagattcac ttattcctac tgaacatacg aaaacaaata gttcggatca accgaccaa      120
acttcggttt ctaacggtta cgtggagcaa aaaggtgaag aagctgctgt gggtagtata      180

```

ES 2 735 996 T3

gcacttgtag atgacgctgg agtaccagaa tgggttaaag ttccctcaaa ggtaaattta 240
gataaattta ctgatttatac tacgaataat atcactatct atcgaattaa caatccggaa 300
gtcttaaaaa cagttaccga tcgtacggat caacggatga aaatgacaga agttatagct 360
aagtatccta atactttgat tatgaatgct tccgcttttg atatgcagac aggacaagta 420
gctggatttc aaattaataa tggaaagttg attcaagact ggagtccagg tacaacgact 480
cagtatgctt ttgttattaa caaagatggt tcgtgcaaaa tttatgattc aagtacacct 540
gcttcaacta ttattaaaaa cggagggcaa caagcctatg attttggtac tgcaattatc 600
cgtgatggta aaattcaacc aagtgatggc tcagtagatt ggaagatcca tatttttatt 660
gcgaatgata aagataataa tctctatgct attttgagt atacaaatgc aggttatgat 720
aatataatga aatcagtgtc aaatttgaag ctccaaaata tgttattact tgatagtggc 780
ggttcaagtc aactatctgt caatggtaaa acgattgttg ctagtcaaga tgatcgagcc 840
gtaccggatt atattgtgat gaaataa 867

<210> 31

<211> 903

5

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

<400> 31

atgaatcaaa aaaagaggcg tcattatcgt aagaaaaaat acacagtact aaaagttatt 60
tcaattatct ttgtattagt aattatctct gttgcttcta tagcctacgt agcttataga 120
aatgttgaat caaccttttc aacatcatat gaaaatttcc ctaaaacaac aagtattgac 180
ttaaaaaaat ctaaaacatt caccacactt atcattgcaa ctggtaaaaa taattctaaa 240
aattcagctt atgctactgt tttagcttca acgaatgtaa agacaaatca aactactttc 300
atgaacttcc cagtttttgc gacactgctt aatcaaaaaa caatcactga agtttacaat 360
acgaatggag atgatggaat tttccagatg gttaaagacc tattgaatgc gtccattaac 420
aaagtaattc agatcgatgt taataaaatg ggatcacttg tacaggccac tgggtggaatc 480
accatgcaaa atccaaaggc attcaatgct gaaggttatg agtttaaca aggaactggt 540
aatttcaaaa ctgctgatca agtccaagcc tatatgacac aaattgacga tactgatttg 600
gatgcttcaa tcaactcggat tcaaaatgct tcaatggaac tctacgtaaa tattaaaaaa 660
attgctcata tgaaaaaact tgaaagtttc aattactatc gagaaattct ctatgctttt 720
tcaaacactg ttaaaaccaa tataagtttc aatgatgcta aaacgatcgt tatgagctac 780
agtaaggctc taaagaatac cagcaagctc aatctacata caacagatga aaatggagct 840
aaggtcgttt ctcaaacaga attagactca gtcaaaaccc tttttgaaaa atctctaaaa 900
taa 903

10

ES 2 735 996 T3

<210> 32

<211> 1431

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

5

<400> 32

```

ttgagtaaca caggaataaa agtaactaat aaccaaacac taataagaaa agtaacagtt      60
atatttttgc ttttttcagg aatttgggta ggagctgcaa caagtgtttt tgagatttct      120
ttagtgtttt ctgtattagc tggatttata agctcaaatt tactagaaaa tgaatttggt      180
ccgtattcag ttattttaat actgggtttt caaaatttat tgataggtac tgggtctcat      240
ttaacagggg atctgtcagg ttttaacttat ctcaactcaag ttccgatggg ttttgtttgg      300
actattaatc tctgtttgaa aaaggtagat aaattatcta aagttgatat ttcttttata      360
gttcttatga tattttcttt gtcactcttg gcatttggac gagggccaat tcaggcaatt      420
atctcgaact taagagattt atcgacattt tattttactt atcgtatagg taaaagattt      480
atcaaaaactg aagaaatatt tgcgagggtt ataaagaaaa ttctttattt aggaatattt      540
gtagttttaa ttggtattat cttatactta ggaggctatc ctctaaacaa atttttggga      600
atagatgaaa tttactacgc taaggggta actactttac ttaataattt tgatggcaga      660
tttggatcag atgtatttgg aatttccgta acacgtatgg gatcaattta ttttgaacca      720
ataaatttgg ggtattttaat attttctatg ctcaattatat cttttatttt cttaataacc      780
caaaaattaa aatatataaa tttatataga ctgattttat tgataggtgg aatgttaact      840
tttgggaaag gtgctatgct tctagctata ggggtgatgg ttgcaggtat cggacataaa      900
ttatttttaa aattcttttc aagaagtaat gaaatgaatg tttttagaaa tctttttata      960
ttgttaacta ttattatggt tatttgggga aattattatt tcaaaacttt tggaggagct     1020
gtagggaaac acttttatgc aatccaaggg acattggata gtataagtca tcgaccaatt     1080
ggttttggat taggtgtggg aggaaacgcc tcagcagtat ttacaggggg agaacttgat     1140
tttactactg gatcagaaac agccttggtt tcatttggat accaaatagg tgtacaaggt     1200
gctattgctt taatatgtgt atttactttt atgagtaaag aagtgttggg aaaagtacag     1260
aagaattcac aattcaaaaa tagattttta ttttatgttc caatgatatt gatttttggt     1320
agtatatatc aagctaatac atatacccca caatgtataa cgttgttaat gattactttg     1380
ggaggatttg taggaatgag agacaggaga aggaaaaaat ataatggtta a              1431

```

10

<210> 33

<211> 702

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

ES 2 735 996 T3

<400> 33

atgataccaa aagtaataca ctattgctgg ttcggagggc aacctttacc agaactctgcg	60
ctaaaatgta ttgaaagttg gagaaggttt tgtccagatt atgaaataaa acaatggctct	120
gagaaaaact atgatgtaaa taaaattcaa tatacaaaag aagcgtacga aaagaaacgt	180
tatgcttttg tcacggatgt tgcaaggctt gatatacatt atagtgaggg gggcatttat	240
cttgacactg atgttgaact gataaaacct ttggatgatt tgcttgtaa tcaagcatat	300
atgggaatgg aaactgctgg tcgtgtaaat accggccaag gatttgagc tataaaaaac	360
caccaaataag ttaaagcaaa tttagagggt tatgctgaac ttgagtttga tggtacgact	420
acttgtgtga cttacacaac taatttgta aaaagatttg gtttcaaaa aaaagatatt	480
aaccaggatt tacaaggaat aactatcctt ccgacagatt atttatgtcc attaagtctt	540
gaaactagga aattagtaat tacagaaaat acattttcta ttcactacta tgatggtggt	600
tggaaaaaag gaaaagataa atttttatct ctaaaaatta aaattcgacg ctggattggt	660
gataactttt atgagtcgat aaaaacgaag ttgaagggat ag	702

REIVINDICACIONES

1. Un queso procesado que incluye componentes antibacterianos y antimicóticos naturales, comprendiendo el queso procesado:
 - 10 a 90 por ciento de queso natural o una mezcla de quesos naturales;
 - 5 uno o más emulsionantes;
 - 8 a 25 por ciento de proteína;
 - 10 a 30 por ciento de grasa;
 - 1 a 20 por ciento de un componente lácteo cultivado, comprendiendo el componente lácteo cultivado una cantidad de nisina eficaz para prevenir la formación de toxinas de *C. botulinum* determinada por el bioensayo de toxinas con ratones en el queso procesado a los niveles de proteína y de grasa durante aproximadamente 9 días a 30 °C (86 °F), en donde el queso procesado incluye 1 a 100 ppm de nisina; y
 - 10,5 a 6 ppm de natamicina.
2. El queso procesado de la reivindicación 1, en donde el queso procesado incluye 2 a 6 ppm de natamicina.
3. El queso procesado de la reivindicación 1, en donde el queso procesado incluye 2 a 5 ppm de natamicina.
- 15 4. El queso procesado de la reivindicación 1, en donde el componente lácteo cultivado se proporciona por fermentación de una cepa aislada de *Lactococcus lactis* que tiene todas las características identificadoras de la cepa ATCC PTA-120552 de *Lactococcus lactis*.
5. El queso procesado de la reivindicación 4, en donde la fermentación de la cepa bacteriana ATCC PTA-120552 se realiza en un medio lácteo líquido 3X a 5X concentrado a una temperatura de 25 a 35 °C y un pH de 5 a 6 durante 15 a 48 horas.
- 20 6. El queso procesado de la reivindicación 1, en donde el queso procesado está libre de conservantes artificiales seleccionados del grupo que consiste en ácido sórbico, sorbato de potasio, nitritos, y sus mezclas.
7. El queso procesado de la reivindicación 1, en donde la nisina es nisina A.
8. Un método de producción de un queso procesado que incluye componentes antibacterianos y antimicóticos naturales, comprendiendo el método:
 - fermentar un medio lácteo líquido con una cepa de *Lactococcus lactis* para producir un componente lácteo cultivado que incluye nisina; y
 - añadir natamicina y 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 8 a 25 por ciento de proteína y 10 a 20 por ciento de grasa;
 - 30 en donde el queso procesado incluye 1 a 20 por ciento del componente lácteo cultivado, y el queso procesado incluye 0,5 a 6 ppm de natamicina y una cantidad de nisina eficaz para prevenir la formación de toxinas de *C. botulinum* determinada por el bioensayo de toxinas con ratones en el queso procesado a los niveles de proteína y de grasa durante aproximadamente 9 días a 30 °C (86 °F), en donde el queso procesado incluye 1 a 100 ppm de nisina.
 - 35
9. El método de la reivindicación 8, en donde el queso procesado incluye 2 a 6 ppm de natamicina.
10. El método de la reivindicación 8, en donde el queso procesado incluye 2 a 5 ppm de natamicina.
11. El método de la reivindicación 8, en donde el componente lácteo cultivado incluye 1 a 100 ppm de nisina.
12. El método de la reivindicación 8, en donde el queso procesado está libre de conservantes artificiales seleccionados del grupo que consiste en ácido sórbico, sorbato de potasio, nitritos, y sus mezclas.
- 40 13. El método de la reivindicación 8, en donde la nisina es nisina A.

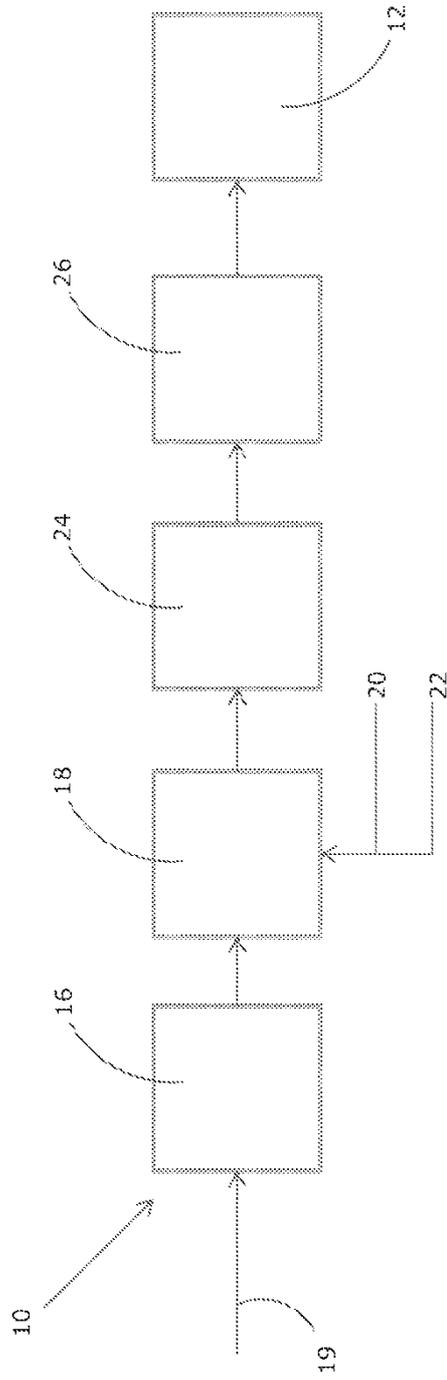


Fig. 1

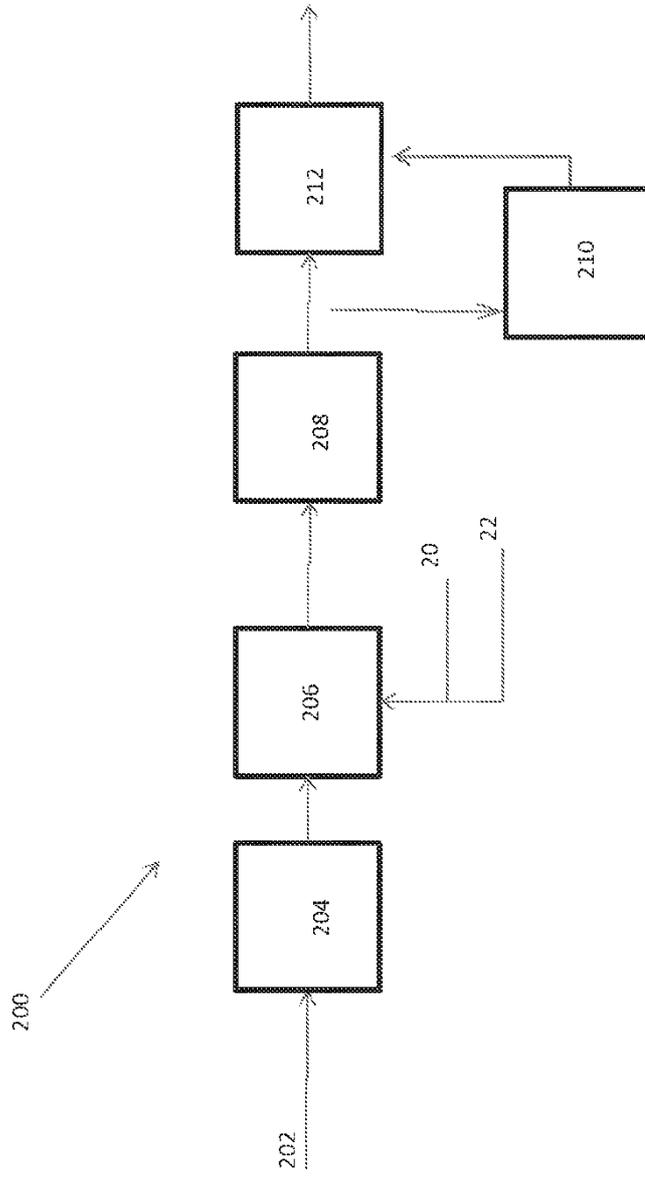


FIG. 1A

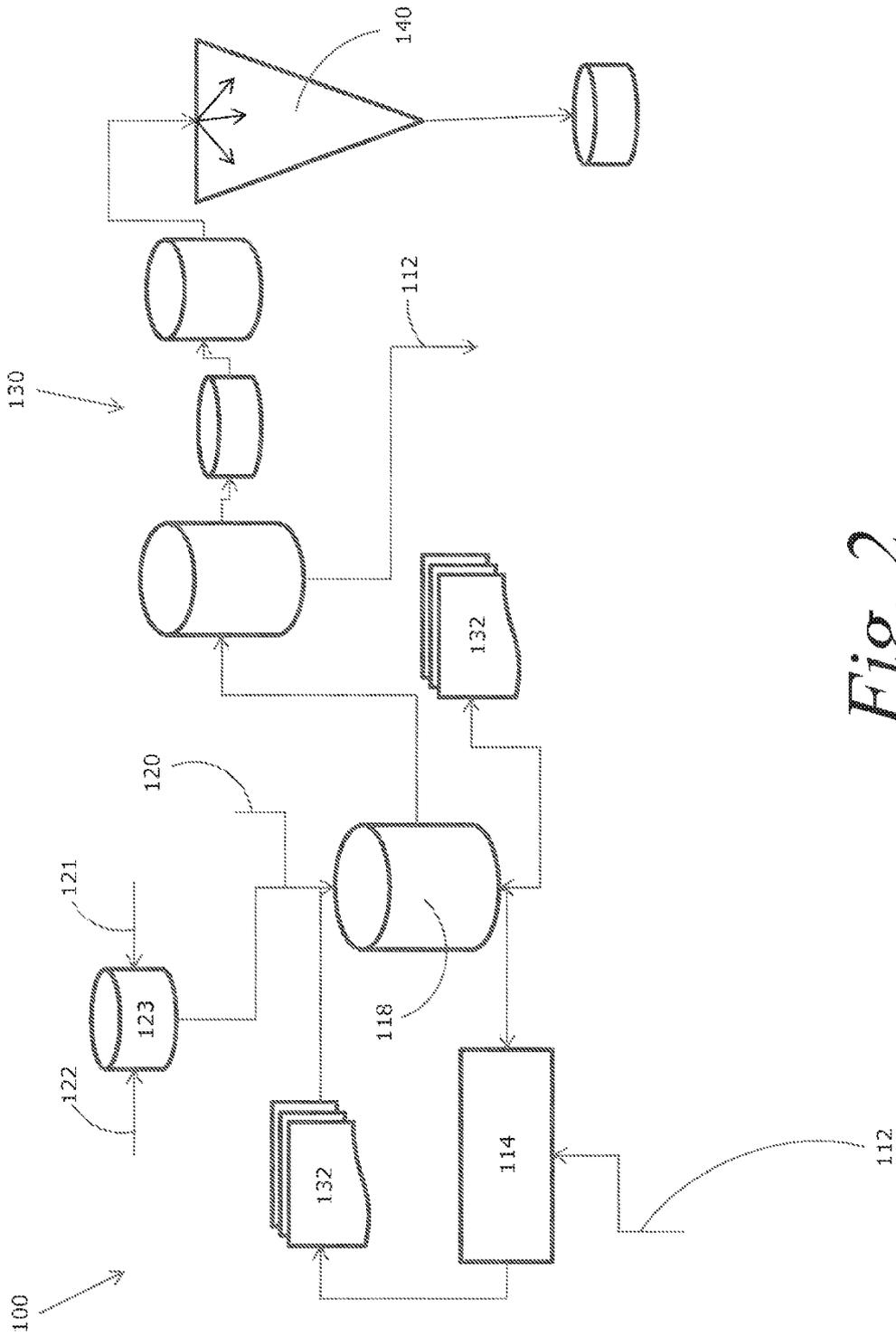


Fig. 2

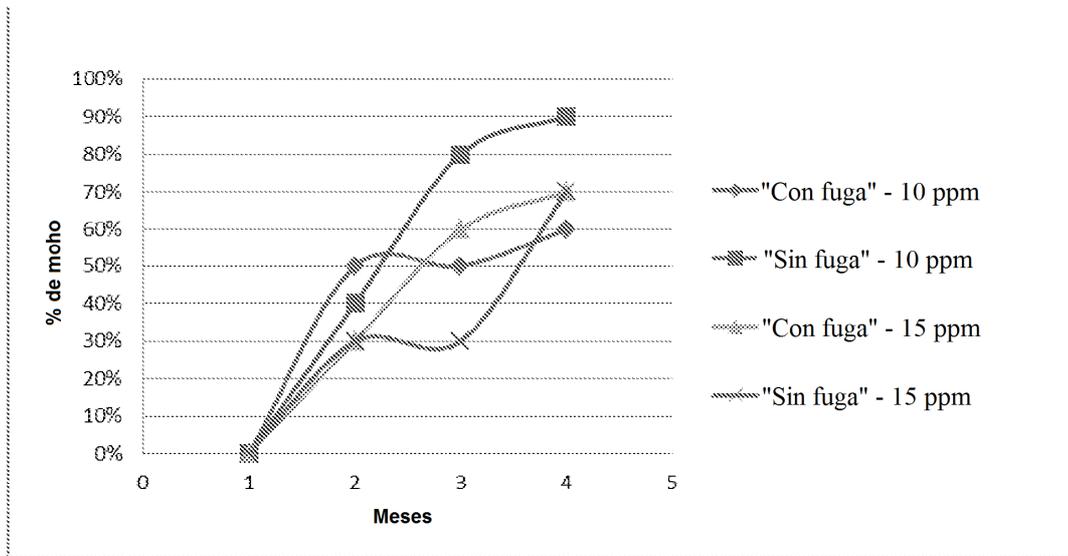


FIG. 3

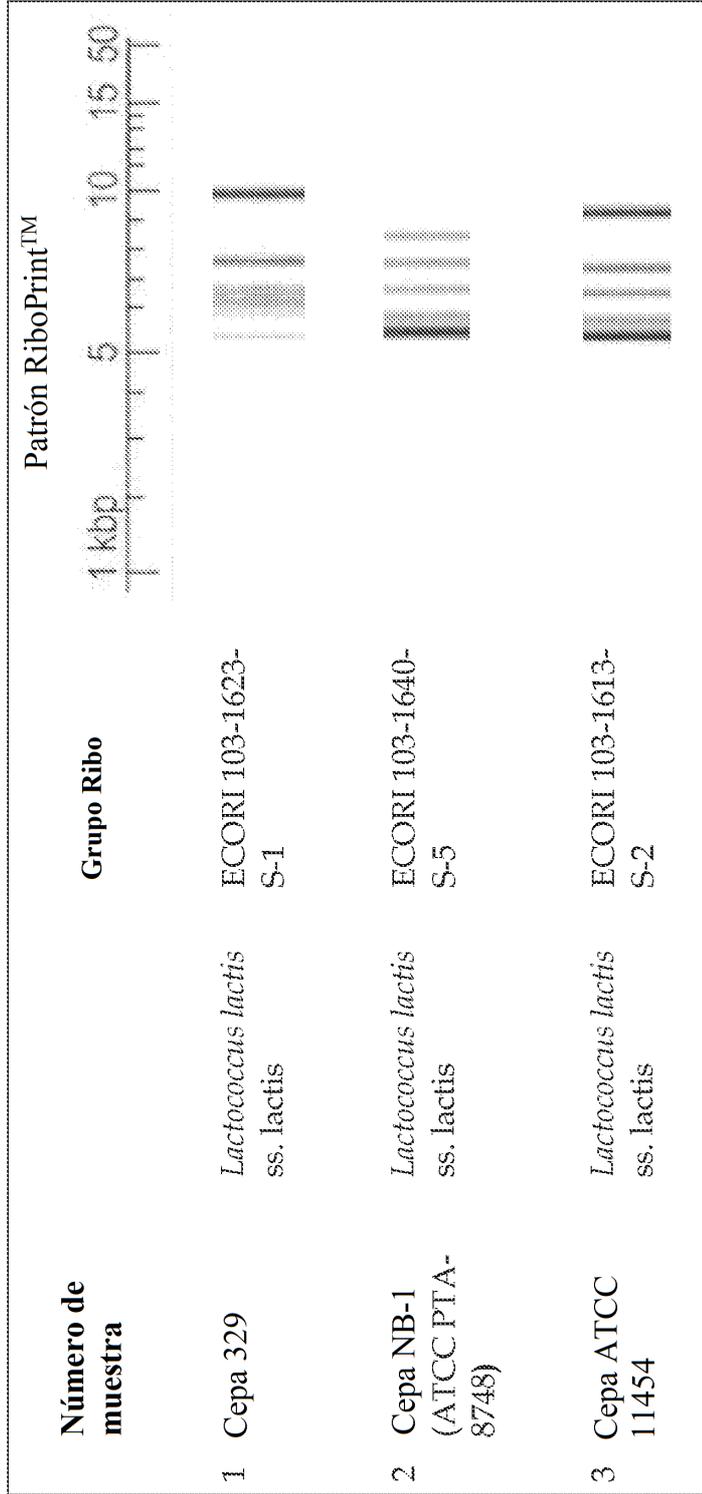
Fago		Hospedador		
Nombre	Número	329	NB-1	ATCC 11454
2T1	61	R	S	R
VT6	136	R	R	R
2-3	151	R	S	R
PP	211	R	R	R
EL-2	213	R	R	R
N046	219	R	R	R
N067	220	R	R	R
NC	221	R	R	R
SP	222	R	R	R

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 Patrón N° 1

Fig. 4



Cepa	Grupo Ribo	Tipo de Ribo
329	EcoRI 103-1623-S-1	3
NB-1	EcoRI 103-1640-S-5	5
ATCC 11454	EcoRI 103-1613-S-2	2

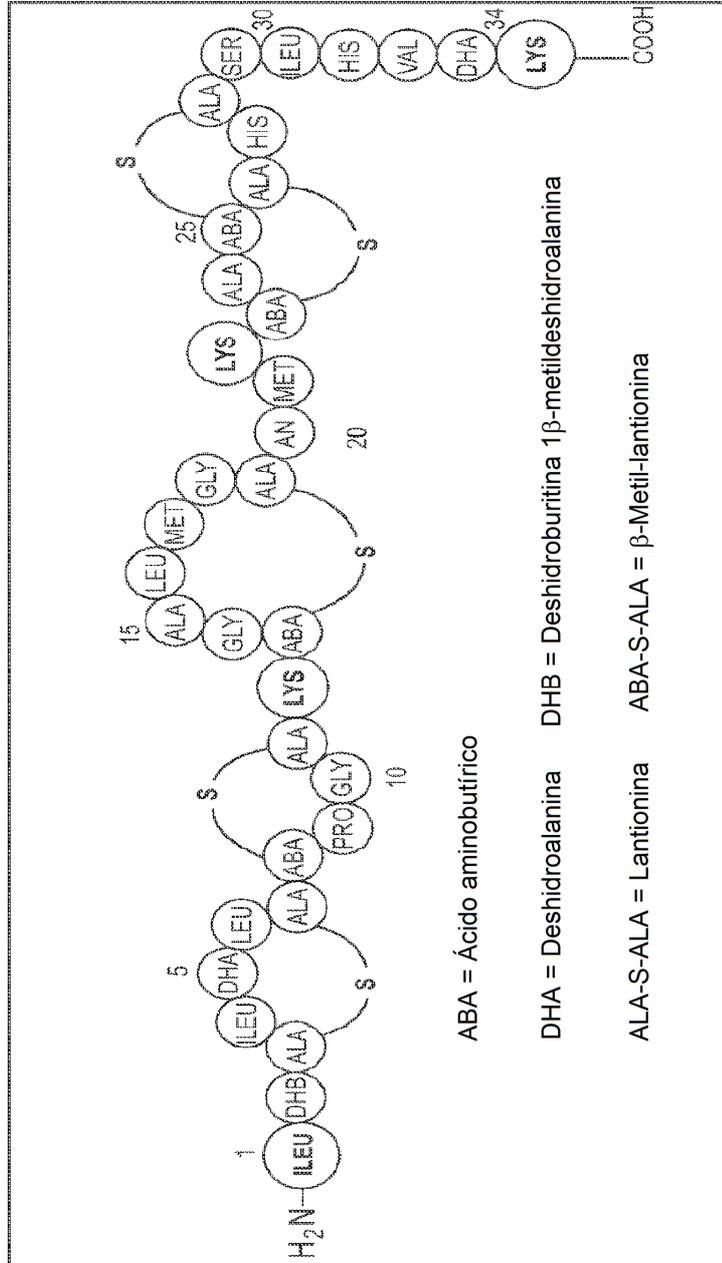
Fig. 5

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 del nombre del gen	Agrupación de EPS
1	0	1	1	1	Familia XRE del regulador transcripcional	
1	0	0	1	1	Esterasa EpsX	
1	0	0	1	0	Modulador transmembranario de la proteína tirosina-cinasa	
1	0	0	1	1	Proteína tirosina-cinasa	
1	0	0	0	0	Undecaprenil-fosfato galactosa	
1	0	0	1	1	Proteína tirosina-fosfatasa dependiente de manganeso	
1	0	0	0	0	Proteína de la biosíntesis de polisacáridos cpsF	
1	0	0	0	0	Glucosiltransferasa cpsg	
1	0	0	0	0	Proteína de la familia 2 de glucosiltransferasa	
1	0	1	0	1	Transferasa del azúcar EpsL	
1	0	0	0	0	Proteína de función desconocida	
1	0	0	0	0	Proteína de función desconocida (extremo posterior del gen similar al operón eps tipo VII de <i>S. thermophilus</i>)	
1	0	0	0	0	Proteína cpsm de la biosíntesis de polisacáridos (porción similar al gen de <i>S. agalactiae</i> en la agrupación de cps)	
1	1	1	1	0	Precursor de nisina Nisina A	
1	1	1	0	0	Proteína de la biosíntesis de NisB	
1	1	1	1	0	Proteína transportadora de nisina y de unión a ATP nisT	
1	1	1	0	0	Proteína de la biosíntesis de nisina NisC	
1	1	1	1	0	Proteína de inmunidad de nisina NisI	
1	1	1	0	1	Serina proteasa procesadora de péptidos conductores de nisina nisP	
1	1	1	1	0	Sistema de dos componentes de la biosíntesis de nisina, regulador de la respuesta NisR	
1	1	1	1	0	Sistema de dos componentes de la biosíntesis de nisina, histina cinasa sensora 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	

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. 6

FIG. 7



Hoja de reemplazo

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)