



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 285 773**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**C12N 9/02** (2006.01)  
**C12P 7/56** (2006.01)  
**C12P 39/00** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**A23C 9/123** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98924059 .3**  
86 Fecha de presentación : **25.05.1998**  
87 Número de publicación de la solicitud: **0985043**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2000**

54 Título: **Cultivos iniciadores bacterianos de ácido láctico y composiciones de éstos.**

30 Prioridad: **30.05.1997 DK 633/97**  
**30.05.1997 US 48337 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.11.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2007**

73 Titular/es: **CHR. HANSEN A/S**  
**Boge Alle 10-12**  
**2970 Hørsholm, DK**

72 Inventor/es: **Kringelum, Børge;**  
**Nilsson, Dan y**  
**Soerfnsen, Kim Ib**

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 285 773 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

Cultivos iniciadores bacterianos de ácido láctico y composiciones de éstos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de cultivos iniciadores bacterianos de ácido láctico y en particular se provee el medio para aumentar el índice de crecimiento y/o controlar la actividad metabólica de las bacterias de ácido láctico cultivando bacterias de ácido láctico en asociación con un organismo auxiliar bacteriano de ácido láctico que  
10 tiene un defecto en su metabolismo pirúvico. Tal organismo auxiliar es también útil como medio para mejorar el tiempo de conservación y/o la calidad de productos comestibles.

**Antecedentes técnicos y técnica anterior**

15 Las bacterias de ácido láctico son usadas extensamente como cultivos iniciadores en la industria alimentaria en la producción de productos fermentados incluyendo productos lácteos tales como p. ej. yogur y queso, productos cárnicos, productos de panadería, vino y productos vegetales.

Tal como se utiliza aquí, el término "bacteria de ácido láctico" se refiere a bacterias gram-positivas, microaero-  
20 fílicas o anaeróbicas que fermentan azúcares con la producción de ácidos incluyendo ácido láctico como el ácido predominantemente producido, ácido acético, ácido fórmico y ácido propiónico. Las bacterias de ácido láctico más útiles industrialmente se encuentran entre las especies *Lactococcus*, tales como *Lactococcus lactis*, especies *Lactobacillus*, especies *Streptococcus*, especies *Leuconostoc*, especies *Pediococcus* y especies *Propionibacterium*. También los anaerobios estrictos pertenecientes al género *Bifidobacterium* se suele incluir generalmente en el grupo de bacterias  
25 de ácido láctico.

Cuando se añade un cultivo iniciador bacteriano de ácido láctico a la leche o cualquier otra materia prima comestible y se dan las condiciones apropiadas para el crecimiento y la actividad metabólica del cultivo iniciador, las bacterias empiezan a propagarse después de un periodo de tiempo, conocido como la fase de latencia, durante la cual las bacterias se adaptan a las nuevas condiciones. Una vez que se inicia la propagación de las bacterias esta es  
30 rápida con conversión concomitante de citrato, lactosa u otros azúcares en ácido láctico/lactato como el metabolito ácido más importante, y posiblemente otros ácidos incluyendo acetato, dando como resultado una reducción del pH. Además, varios otros metabolitos tales como p. ej. acetaldheído,  $\alpha$ -acetolactato, metilacetilcarbonilo, diacetilo y 2,3-butilenoglicol (butanodiol) son producidos durante el crecimiento de las bacterias de ácido láctico.

Generalmente, el índice de crecimiento y la actividad metabólica de los cultivos iniciadores bacterianos de ácido láctico pueden ser controlados seleccionando las condiciones de crecimiento apropiadas para las cepas del cultivo iniciador específico usado tal como la temperatura de crecimiento apropiada, tensión del oxígeno y contenido de nutrientes. Así, en la industria lechera se sabe que una reducción del contenido de oxígeno de la materia prima  
40 de la leche supondrá un crecimiento más rápido de las bacterias de ácido láctico añadidas que a su vez producirá una acidificación más rápida de la leche inoculada. Habitualmente, tal reducción del contenido de oxígeno se realiza calentando la leche en sistemas abiertos, desaireando la leche al vacío o por un tratamiento de aspersión. Los medios alternativos de reducción del contenido de oxígeno incluyen la adición de compuestos de eliminación de oxígeno.

Los cultivos iniciadores bacterianos del ácido láctico son comúnmente usados en la industria alimentaria como cultivos de cepas mezcladas comprendiendo una o varias especies. Para un número de cultivos de cepas mezcladas tales como cultivos iniciadores del yogur comprendiendo normalmente cepas de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, se ha detectado una relación simbiótica entre las especies, presuntamente debido a la actividad proteolítica de al menos una de las cepas (Rajagopal *et al.* J. Dairy Sci., 1990 73:894-899). También se ha informado sobre que en tales cultivos mixtos para el yogurt, la estimulación del crecimiento del componente *Lactobacillus* se debe a la formación inherente de ácido fórmico por el *Streptococcus thermophilus* (Suzuki *et al.*, 1986). Otro ejemplo de relación simbiótica entre cepas en un cultivo mixto se describe en EP 0 111 392 A2 donde se demuestra que las cepas de *Streptococcus thermophilus* tipo salvaje seleccionadas tienen una capacidad de consumir oxígeno relativamente alta que mejora la supervivencia de una especie *Bifidobacterium* estrictamente anaeróbica cuando se combina con la cepa de *Streptococcus*.  
55

No obstante, la técnica anterior no informa de ningún método biológico generalmente aplicable por el cual pueda mejorarse el crecimiento y la actividad metabólica de cultivos iniciadores bacterianos de ácido láctico. En consecuencia, un objetivo principal de la presente invención es proveer tal método.  
60

**Resumen de la invención**

Por consiguiente, la presente invención se refiere en un primer aspecto a un método para aumentar el índice de crecimiento y/o controlar la actividad metabólica de una cepa bacteriana de ácido láctico, comprendiendo el cultivo de la cepa en asociación con un organismo auxiliar bacteriano de ácido láctico que es defectuoso en su metabolismo pirúvico.  
65

En otro aspecto se provee un método para mejorar el tiempo de conservación y/o la calidad de un producto comestible comprendiendo la adición al producto de una cepa bacteriana de ácido láctico que es defectuosa en su metabolismo pirúvico y en otro aspecto más la invención se refiere a una composición del cultivo iniciador que comprende una bacteria de ácido láctico y un organismo auxiliar bacteriano de ácido láctico que es defectuoso en su metabolismo pirúvico, dicho organismo auxiliar siendo capaz de aumentar el índice de crecimiento y/o controlar la actividad metabólica de la bacteria de ácido láctico.

En aún otro aspecto la invención se refiere a una bacteria de ácido láctico que es defectuosa en al menos una enzima implicada en el metabolismo pirúvico y en el cual un gen capaz de regenerar el NAD<sup>+</sup> es sobreexpresado.

### Descripción detallada de la invención

Es un objetivo principal de la presente invención proveer un método generalmente aplicable para aumentar el índice de crecimiento y/o controlar la actividad metabólica de un cultivo iniciador bacteriano de ácido láctico. El método comprende cultivar el cultivo en asociación con un organismo auxiliar bacteriano de ácido láctico que es defectuoso en su metabolismo pirúvico.

Se entenderá que la mejora del índice de crecimiento se refiere a cualquier efecto que de como resultado un número más alto de células del cultivo iniciador en el medio después de un periodo de tiempo dado, es decir las células bacterianas de ácido láctico se propagan en un índice más alto que el obtenido sin el organismo auxiliar, o las células empiezan a propagarse en un punto anterior en el tiempo en un índice igual o superior en comparación con la propagación de las bacterias de ácido láctico sin el organismo auxiliar.

Tal como se utiliza aquí, la expresión “controlar la actividad metabólica” se refiere a la mayor o menor producción de cualquier metabolito producido por el cultivo iniciador, incluyendo la producción de ácidos, tales como ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico y/o ácido propiónico. Ejemplos de otros metabolitos de relevancia, cuya producción puede ser controlada, incluyen compuestos aromáticos tales como acetaldeído,  $\alpha$ -acetolactato, metilacetilcarbonilo, diacetilo y 2,3-butilienoglicol (butanodiol).

Según la invención, el organismo auxiliar bacteriano de ácido láctico es defectuoso en su metabolismo pirúvico. Tal como se utiliza aquí, la expresión “defectuoso en su metabolismo pirúvico” indica que el organismo auxiliar en comparación con la cepa genitora tiene un metabolismo pirúvico alterado, es decir una mayor o menor producción de uno o más metabolitos derivados del piruvato.

Tal metabolismo pirúvico alterado puede ser el resultado de que el organismo auxiliar sea defectuoso en su capacidad para expresar al menos una enzima seleccionada del grupo consistente en piruvato formato liasa, piruvato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, acetolactato sintetasa, acetolactato sintetasa secundario, acetolactato decarboxilasa y diacetil reductasa. Tal como se utiliza aquí, la expresión “defectuoso en su capacidad de expresar cualquiera de las enzimas anteriores” indica que el organismo auxiliar en comparación con la cepa genitora de la que proviene tiene una menor producción de la enzima o que la enzima no es expresada en absoluto, sin tener en cuenta las condiciones de crecimiento.

Ejemplos de organismos auxiliares bacterianos de ácido láctico que son defectuosos en su capacidad para expresar al menos una de las enzimas anteriormente mencionadas incluyen la cepa *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* DN223 que es defectuosa tanto en la enzima piruvato formato liasa (Pfl<sup>-</sup>) como en la enzima lactato deshidrogenasa (Ldh<sup>-</sup>) y la cepa *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* DN224 que es defectuosa en Ldh.

En una forma de realización útil del método anterior, el cultivo de una cepa bacteriana de ácido láctico del cultivo iniciador en asociación con el organismo auxiliar produce una mayor producción de ácido de la cepa.

Evidentemente, la mayor producción de ácidos mencionada arriba supondrá una reducción del pH del medio inoculado con el cultivo asociativo (un cultivo iniciador en asociación con el organismo auxiliar según la invención) que excede aquel obtenido en el mismo medio inoculado con el cultivo iniciador solo. La diferencia de pH del medio inoculado con el cultivo iniciador solo y el medio inoculado con el cultivo asociativo es denominada aquí  $\Delta$ pH. En formas de realización útiles de la invención la producción de ácido produce un  $\Delta$ pH de al menos 0,05 después de 3 horas o más de cultivo, tal como un  $\Delta$ pH de al menos 0,1 después de 3 horas o más de cultivo, p. ej. un  $\Delta$ pH de al menos 0,5 después de 3 horas o más de cultivo, tal como un  $\Delta$ pH de al menos 0,8 después de 3 horas o más de cultivo, p. ej. un  $\Delta$ pH de al menos 1,0 después de 3 horas o más de cultivo.

En formas de realización útiles de la presente invención el cultivo iniciador bacteriano de ácido láctico es un cultivo de cepas mezcladas comprendiendo al menos dos cepas de bacterias de ácido láctico. En los ejemplos posteriores se describen ejemplos de tales cultivos de cepas mezcladas. Así, en formas de realización particularmente preferidas de la invención el organismo auxiliar es capaz de aumentar el índice de crecimiento de al menos una de las cepas del cultivo de cepas mezcladas y/o capaz de controlar la actividad metabólica de al menos una de las cepas del cultivo de cepas mezcladas bacteriano de ácido láctico. No se pueden cumplir todas las condiciones de crecimiento que sean óptimas en todos los aspectos para todas las cepas de tales cultivos de cepas mezcladas bacterianos de ácido láctico. En consecuencia, la actividad metabólica de un cultivo de cepas mezcladas puede ser controlada selectivamente seleccionando una temperatura que favorezca una mayor producción de metabolitos deseados por una o más cepas, pero

## ES 2 285 773 T3

que en cambio puede provocar una menor producción de otros metabolitos por otras cepas. No obstante, el resultado global de cultivar un cultivo de cepas mezcladas bacteriano de ácido láctico con un organismo auxiliar según la invención en comparación con el cultivo de cepas mezcladas bacteriano de ácido láctico que es cultivado solo es un mayor número de células, una mayor producción de uno o más metabolitos, incluyendo ácidos y compuestos aromáticos y/o una menor producción de uno o más metabolitos.

La producción industrial de productos comestibles normalmente incluye fases del proceso tales como mezcla, bombeo o enfriamiento mediante las cuales se aumenta el grado de saturación de oxígeno del producto comestible y, como resultado, la materia prima del producto comestible puede tener un contenido inicial de oxígeno relativamente alto (grado alto de saturación de oxígeno) que es desfavorable para los cultivos iniciadores bacterianos de ácido láctico. Se acaba de descubrir sorprendentemente que cuando el cultivo iniciador es cultivado en una materia prima del producto comestible con un grado inicial de saturación de oxígeno de 10% o superior tal como 20% o superior en asociación con un organismo auxiliar según la invención, su índice de crecimiento es sustancialmente mejorado y/o su actividad metabólica es controlada en comparación con el cultivo sin el organismo auxiliar según las mismas condiciones.

En formas de realización útiles de la invención el organismo auxiliar es una bacteria de ácido láctico capaz de reducir la cantidad de oxígeno presente en el medio. Así, en formas de realización particularmente preferidas de la invención el organismo auxiliar es capaz de reducir la cantidad de oxígeno presente en el medio en al menos el 1% por hora incluyendo hasta al menos el 10% por hora, tal como al menos el 20% por hora, p. ej. al menos el 30% por hora. La reducción puede incluso ser de al menos el 40% por hora incluyendo hasta al menos el 50% por hora, tal como al menos el 60% por hora, p. ej. al menos el 70% por hora, tal como al menos el 80% o al menos el 90% por hora.

El método de aumentar el índice de crecimiento y/o controlar la actividad metabólica según la invención implica que puede obtenerse un mayor índice de crecimiento y/o control de la actividad metabólica del cultivo iniciador bacteriano de ácido láctico incluso en un medio que tenga un grado bajo de saturación de oxígeno, tal como en el rango de 1-10%. No obstante, el método puede ser particularmente útil cuando el cultivo iniciador bacteriano de ácido láctico es cultivado en una materia prima del producto comestible con una saturación de oxígeno inicial de 10% o más, p. ej. 20% o más, tal como 40% o más, p. ej. 50% o más, tal como 60% o más, p. ej. 70% o más, tal como 80% o más, y p. ej. 90% o más, tal como una saturación de oxígeno inicial de 95% o más.

En general, el organismo auxiliar es un derivado de una bacteria de ácido láctico. Tal como se utiliza aquí, la expresión "derivado de una bacteria de ácido láctico" comprende un ácido láctico bacteriano mutante que es derivado seleccionando un mutante espontáneo de una cepa tipo salvaje de una bacteria de ácido láctico o de forma alternativa, construyendo un mutante de una cepa bacteriana de ácido láctico tipo salvaje o una cepa previamente mutada. Esta construcción puede ser hecha sometiendo una cepa a cualquier tratamiento de mutagenización convencional incluyendo tratamiento con mutágenos químicos y luz UV.

También se puede construir un mutante por modificaciones genéticas en la cepa genitora incluyendo deleciones, inserciones, sustituciones de nucleótidos. Estas modificaciones genéticas pueden ser obtenidas por técnicas conocidas en la técnica para introducir modificaciones de este tipo, incluyendo técnicas de recombinación de ADN incluyendo mutagénesis dirigidas al sitio, técnicas de reacción en cadena de la polimerasa, mutagénesis aleatoria o cuasialeatoria usando cualquier mutágeno, mutagénesis *in vitro* o cualquier otro método conocido para introducir modificaciones genéticas en sustancias comprendiendo o procediendo de ácidos nucleicos de origen natural o aminoácidos. Según la invención, el derivado de una bacteria de ácido láctico puede p. ej. provenir de una especie *Lactococcus*, tal como *Lactococcus lactis*, una especie *Lactobacillus*, una especie *Streptococcus*, una especie *Leuconostoc*, una especie *Pediococcus*, una especie *Propionibacterium* o una especie *Bifidobacterium*.

En este contexto, una especie preferida es *Lactococcus lactis* incluyendo *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* incluyendo la biovariedad *diaceylactis*. Ejemplos de organismos auxiliares son la cepa de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* DN223 que ha sido depositada con el número de registro DSM 11036 y la cepa de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* DN224 que ha sido depositada bajo el número de registro DSM 11037. Las cepas DN223 y DN224 están descritas en WO 98/07843. En los siguientes ejemplos de referencia se dan detalles para aislar estas cepas.

Se ha descubierto que los derivados, tales como las cepas DN223 y DN224 anteriores, que tienen, con respecto a sus genitores, una producción reducida de ácido, son particularmente adecuadas en el método anterior de aumentar el índice de crecimiento o controlar la actividad metabólica.

El aumento del índice de crecimiento y/o la actividad metabólica controlada obtenida por el método anterior puede ser provisto cultivando el cultivo iniciador en cualquier medio que soporte el crecimiento de bacterias de ácido láctico. Así, el efecto puede ser obtenido en una variedad de componentes de productos comestibles o ingredientes tales como leche, carne, masa de harina, vino y materias vegetales, tales como verduras, frutas o cereales.

El cultivo iniciador y el organismo auxiliar se añade en cantidades que produzcan un número de células viables de cada componente que es al menos  $10^3$  unidades formadoras de colonias (CFU) por gramo de materia prima del producto comestible, tal como al menos  $10^4$  CFU/g incluyendo al menos  $10^5$  CFU/g, tal como al menos  $10^6$  CFU/g, p. ej. al menos  $10^7$  CFU/g, tal como al menos  $10^8$  CFU/g, p. ej. al menos  $10^9$  CFU/g, tal como al menos  $10^{10}$  CFU/g, p. ej. al menos  $10^{11}$  CFU/g de las materias primas del producto comestible.

## ES 2 285 773 T3

En formas de realización preferidas de la presente invención la proporción entre células del organismo auxiliar y células del cultivo bacteriano de ácido láctico se encuentra en el rango de 1000:1 a 1:1000 tal como 500:1 a 1:500, p. ej. 100:1 a 1:100, tal como en el rango de 50:1 a 1:50, p. ej. en el rango de 20:1 a 1:20, tal como en el rango de 10:1 a 1:10 o en el rango de 5:1 a 1:5 tal como en el rango de 2:1 a 1:2.

5 En el metabolismo de las bacterias de ácido láctico se requiere regenerar el  $\text{NAD}^+$ . Varias de las enzimas implicadas en el metabolismo pirúvico incluyendo Ldh son capaces de esta regeneración convirtiendo el piruvato en lactato. Por consiguiente, en una cepa bacteriana de ácido láctico que tiene un defecto en su metabolismo pirúvico que implica que la capacidad de la cepa para regenerar  $\text{NAD}^+$  es reducida, hay una demanda de formas alternativa de proveer la cantidad requerida de este compuesto esencial. Una tal forma alternativa que está disponible de forma natural en las bacterias de ácido láctico es la regeneración mediante NADH oxidasas de las cuales se han provisto tres tipos (Condon; 1987). Los dos primeros son flavoproteínas no hemo, una de las cuales cataliza la reducción de  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la otra la reducción de  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ . Un ejemplo del tipo último de enzima, es decir una NADH oxidasa que forma  $\text{H}_2\text{O}$  es la enzima codificada por el gen *nox*. Esta enzima regenera dos equivalentes de  $\text{NAD}^+$  bajo consumo de oxígeno. 15 En consecuencia se ha contemplado que el efecto de aumento de un organismo auxiliar según la invención puede ser ulteriormente mejorado sobreexpresando una enzima de reducción de  $\text{O}_2$  (es decir de consumo de  $\text{O}_2$ ) incluyendo la enzima codificada por un gen *nox* presente en el organismo.

Por consiguiente, en otra forma de realización del presente método el organismo auxiliar es uno donde un gen de codificación de una enzima que es capaz de regenerar  $\text{NAD}^+$  incluyendo las NADH oxidasas anteriores es sobreexpresado. En el presente contexto, el término "sobreexpresado" indica que el nivel de expresión del gen es aumentado respecto a aquel de la cepa genitora de donde proviene el organismo auxiliar que sobreexpresa el gen. Así, un organismo auxiliar que es capaz de sobreexpresar el gen que codifica la enzima que regenera el  $\text{NAD}^+$  preferiblemente expresa el gen a un nivel que es al menos el 10% superior al nivel en la que el gen es expresado en el genitor tal como al menos el 25% superior, p. ej. al menos el 50% superior. Es particularmente preferido que el nivel de expresión sea al menos el 100% superior a aquel del genitor. 20

La sobreexpresión del gen puede ser provista por métodos que son conocidos en la técnica tales como p. ej. introducir en el organismo auxiliar múltiples copias del gen en el cromosoma y/o en elementos extracromosómicos incluyendo plásmidos, fagos o cósmidos. 30

De forma alternativa, la sobreexpresión es el resultado de enlazar operativamente un gen o genes de origen natural en el organismo auxiliar o un gen/genes que es/son insertado(s) en el organismo a una secuencia reguladora que potencia la expresión bien a nivel transcripcional o translacional. En este contexto, una técnica útil es enlazar operativamente el gen a un promotor homólogo o heterólogo fuerte que opcionalmente sea un promotor regulable. Promotores interesantes son los promotores ARNt y ARNr incluyendo los promotores PI y PII y el promotor *purD* de *Lactococcus lactis* de la subespecie *lactis* como se describe en WO 94/16086 a la que se hace referencia. 35

Un promotor regulable que regule la expresión del gen de codificación de una enzima de regeneración de  $\text{NAD}^+$  puede idóneamente ser regulado por un factor seleccionado entre el pH, la temperatura de crecimiento, una variación de temperatura que suscite la expresión de genes de shock térmico, la composición del medio de crecimiento incluyendo el contenido de resistencia iónica/ $\text{NaCl}$  y la presencia/ausencia de precursores de nucleótidos de purina, y la fase de crecimiento/índice de crecimiento de la bacteria. 40

Es también posible obtener un organismo auxiliar con una mayor actividad regeneradora de  $\text{NAD}^+$  alterando la estructura de la enzima p. ej. modificando la secuencia de codificación o post-translacionalmente por métodos que son conocidos *per se*. En el presente contexto, un ejemplo de una enzima regeneradora de  $\text{NAD}^+$  adecuada es la NADH oxidasa codificada por el gen *nox*. 45

Según el presente método, el organismo auxiliar capaz de sobreexpresar una enzima regeneradora de  $\text{NAD}^+$  incluye un organismo donde la enzima cataliza la reducción de  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , p. ej. la enzima que tiene la SEC ID No:2 como se muestra abajo. En formas de realización útiles el organismo auxiliar es una cepa Ldh<sup>-</sup>. 50

Como se ha descrito anteriormente, las cepas bacterianas de ácido láctico que son defectuosas en sus metabolismo pirúvico incluyen cepas que son capaces de reducir la cantidad de oxígeno en un medio. Se ha descubierto que las cepas de este tipo, cuando se usan solas, es decir sin la adición concomitante de una cepa del cultivo iniciador, pueden mejorar el tiempo de conservación de los productos comestibles. Por consiguiente, es otro objetivo de la invención proveer un método para mejorar el tiempo de conservación y/o la calidad de un producto comestible, comprendiendo la adición al producto de una cepa bacteriana de ácido láctico que es defectuosa en su metabolismo pirúvico como se ha definido arriba. Tal como se utiliza aquí, el término "tiempo de conservación" indica el periodo de tiempo en el que el producto comestible es aceptable para el consumo. En una forma de realización útil, la cepa bacteriana de ácido láctico es una que tiene una producción reducida de ácido láctico incluyendo una cepa que esencialmente no produce ácido láctico. 55

Según la invención, una cepa bacteriana de ácido láctico que es útil para mejorar el tiempo de conservación de productos comestibles incluye una cepa como se ha descrito anteriormente donde un gen de codificación de una enzima que es capaz de regenerar  $\text{NAD}^+$  incluyendo las NADH oxidasas anteriores es sobreexpresado. 65

## ES 2 285 773 T3

El efecto de mejora del tiempo de conservación puede ser obtenido en una variedad de componentes o ingredientes de producto comestible tales como leche incluyendo leche no pasteurizada (cruda), carne, masa de harina, vino y materias vegetales, tales como verduras, frutas o cereales. Tal como se utiliza aquí, el término “leche” se entiende que significa cualquier tipo de leche o componente de la leche incluyendo p. ej. leche de vaca, leche humana, leche de búfalo, leche de cabra, leche de oveja, productos lácteos hechos de leche de este tipo, o lactosuero.

El índice en el que el cultivo bacteriano de ácido láctico arriba elimina oxígeno depende de las condiciones del medio, p. ej. la temperatura. Con temperaturas en los componentes o ingredientes del producto comestible frecuentemente siendo inferior a la temperatura ambiente, tal como por debajo de 10°C, p. ej. debajo de 5°C, el índice con el cual se elimina oxígeno puede ser tan bajo como el 1% por hora y además influye en el tiempo de conservación y/o la calidad del producto comestible.

Cuando se usa según el método anterior el cultivo bacteriano de ácido láctico no acidificante este es preferiblemente mezclado con el producto comestible en el lugar de producción. Así, como ejemplo, cuando el producto comestible es leche cruda no pasteurizada, el cultivo bacteriano de ácido láctico puede ser añadido en la granja lechera a la leche después del ordeño. Convenientemente, el cultivo se añade a la leche fresca en un tanque de enfriamiento en la granja lechera o a un tanque de almacenamiento en una central lechera.

Según el método de la presente invención es también posible conseguir una mejora del rendimiento de la biomasa durante la producción del cultivo iniciador dentro de un periodo de tiempo dado. Así, este efecto puede ser obtenido cuando el volumen del cultivo iniciador es aumentado gradualmente, a lo que también se denomina en la técnica como “sistemas iniciadores de desecho”.

Como se ha mencionado anteriormente, la invención provee en otro aspecto una composición del cultivo iniciador comprendiendo al menos una cepa de una bacteria de ácido láctico y un organismo auxiliar bacteriano de ácido láctico en el modo descrito anteriormente que es defectuoso en su metabolismo pirúvico como se ha descrito también anteriormente, incluyendo un organismo auxiliar que tiene una producción reducida de ácido láctico tal como una cepa que esencialmente no produce ácido láctico.

Normalmente, las composiciones de este tipo comprenden las bacterias en una forma concentrada incluyendo concentrados congelados, secos o secados por congelación teniendo normalmente una concentración de células viables que es al menos 10<sup>5</sup> CFU por gramo de la composición, tal como al menos 10<sup>6</sup> CFU/g incluyendo al menos 10<sup>7</sup> CFU/g, p. ej. al menos 10<sup>8</sup> CFU/g, p. ej. al menos 10<sup>10</sup> CFU/g, tal como al menos 10<sup>11</sup> CFU/g, p. ej. al menos 10<sup>12</sup> CFU/g, tal como al menos 10<sup>13</sup> CFU/g de la composición. La composición puede contener como componentes adicionales crioprotectores y/o aditivos convencionales incluyendo nutrientes tales como extracto de levadura, azúcares y vitaminas.

Según la invención también se provee una bacteria de ácido láctico que es defectuosa en al menos una enzima implicada en el metabolismo pirúvico como se ha descrito anteriormente y en la cual un gen capaz de regenerar NAD<sup>+</sup> es sobreexpresado, incluyendo un gen de codificación de una enzima que cataliza la reducción de O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tal como una NADH:H<sub>2</sub>O oxidasa incluyendo la enzima que tiene la SEC ID No:2.

Como se ha mencionado anteriormente, la invención también provee un fragmento de ADN aislado derivado de una bacteria de ácido láctico que comprende un gen de codificación de un polipéptido que tiene actividad NADH:H<sub>2</sub>O oxidasa tal como un fragmento de ADN que es seleccionado del grupo que consiste en la secuencia mostrada en la SEC ID No:1 y una variante o derivado de ésta que es al menos el 50% p. ej. al menos el 60% incluyendo al menos el 70% idéntico a dicha secuencia, y una molécula de ADN recombinante comprendiendo tal fragmento de ADN. En el presente contexto, la expresión “variante o derivado” se refiere a cualquier modificación, incluyendo mutaciones, de la secuencia de ADN de la secuencia específica anterior incluyendo la sustitución, adición o delección de unos o más nucleótidos.

La invención es ilustrada con más detalle en los siguientes ejemplos de referencia, ejemplos y el dibujo donde:

La Fig. 1 ilustra el efecto en los índices de acidificación del cultivo iniciador bacteriano de ácido láctico mesofílico B-11 cultivado en leche entera poco pasteurizada a 30°C solo (0,01% en peso) y en asociación con la cepa de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* DN223 y DN224, respectivamente, en las concentraciones siguientes: 0,005% en peso, 0,01% en peso a 0,02% en peso,

La Fig. 2 ilustra el efecto en los índices de acidificación del cultivo iniciador bacteriano de ácido láctico mesofílico B-11 cultivado en leche entera ecológica poco pasteurizada a 30°C solo (0,01% en peso) y en asociación con la cepa de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* DN223 y DN224, respectivamente, en las concentraciones siguientes: 0,005% en peso; 0,01% en peso a 0,02% en peso,

La Fig. 3 ilustra el efecto en los índices de acidificación del cultivo iniciador bacteriano del ácido láctico mesofílico B-11 cultivado en leche desnatada muy pasteurizada a 30°C solo (0,01% en peso) y en asociación con la cepa de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* DN223 y DN224, respectivamente, en las concentraciones siguientes: 0,005% en peso; 0,01% en peso a 0,02% en peso,

## ES 2 285 773 T3

La Fig. 4 ilustra la acidificación de leche entera poco pasteurizada inoculada con el cultivo de yogurt iniciador bacteriano de ácido láctico termofílico YC-460 (0,02% en peso), el organismo auxiliar DN223 (0,003% en peso) y YC-460 (0,02% en peso) en asociación con DN223 (0,003% en peso), respectivamente,

5 La Fig. 5 ilustra la acidificación de leche entera ecológica poco pasteurizada inoculada con el cultivo de yogurt iniciador bacteriano de ácido láctico termofílico YC-460 (0,02% en peso), el organismo auxiliar DN224 (0,003% en peso) y YC-460 (0,02% en peso) en asociación con DN224 (0,003% en peso), respectivamente,

10 La Fig. 6A ilustra la acidificación de leche entera ecológica poco pasteurizada inoculada con el cultivo de yogurt iniciador bacteriano de ácido láctico termofílico YC-460 (0,02% en peso), el organismo auxiliar DN223 (0,003% en peso) y YC-460 (0,02% en peso) en asociación con DN223 (0,003% en peso), respectivamente,

15 La Fig. 6B ilustra el efecto en la concentración de oxígeno de leche entera ecológica poco pasteurizada inoculada con el cultivo de yogurt iniciador bacteriano de ácido láctico termofílico YC-460 (0,02% en peso), el organismo auxiliar DN223 (0,003% en peso) y YC-460 (0,02% en peso) en asociación con DN223 (0,003% en peso), respectivamente,

20 La Fig. 7A ilustra la acidificación de leche entera ecológica poco pasteurizada inoculada con el cultivo de yogurt iniciador bacteriano de ácido láctico termofílico YC-460 (0,02% en peso), el organismo auxiliar DN224 (0,003% en peso) y YC-460 (0,02% en peso) en asociación con DN224 (0,003% en peso), respectivamente,

25 La Fig. 7B ilustra el efecto en la concentración de oxígeno de leche entera ecológica poco pasteurizada inoculada con el cultivo de yogurt iniciador bacteriano de ácido láctico termofílico YC-460 (0,02% en peso), el organismo auxiliar DN224 (0,003% en peso) y YC-460 (0,02% en peso) en asociación con DN224 (0,003% en peso), respectivamente,

30 La Fig. 8A ilustra la acidificación de leche entera ecológica poco pasteurizada inoculada con el cultivo iniciador bacteriano de ácido láctico mesofílico B-11 (0,01% en peso), DN223 (0,0015% en peso) y B-11 (0,01% en peso) en asociación con DN223 (0,0015% en peso),

35 La Fig. 8B ilustra el efecto de la concentración de oxígeno de leche entera ecológica poco pasteurizada inoculada con el cultivo iniciador bacteriano de ácido láctico mesofílico B-11 (0,01% en peso), DN223 (0,0015% en peso) y B-11 (0,01% en peso) en asociación con DN223 (0,0015% en peso),

40 La Fig. 9A ilustra la acidificación de leche entera ecológica poco pasteurizada inoculada con el cultivo iniciador bacteriano de ácido láctico mesofílico B-11 (0,01% en peso), DN224 (0,0015% en peso) y B-11 (0,01% en peso) en asociación con DN224 (0,0015% en peso),

45 La Fig. 9B ilustra el efecto de la concentración de oxígeno de leche entera ecológica poco pasteurizada inoculada con el cultivo iniciador bacteriano de ácido láctico mesofílico B-11 (0,01% en peso), DN224 (0,0015% en peso) y B-11 (0,01% en peso) en asociación con DN224 (0,0015% en peso).

### Ejemplos de referencia

#### 45 *Materiales y métodos*

##### 1. Cepas bacterianas, medios y condiciones de crecimiento

50 Las cepas bacterianas de ácido láctico siguientes fueron usadas en los ejemplos de referencia: cepas de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* 1 FHCY-1, MG1363 y CHCC373 (Colección de Cultivos Chr. Hansen) y *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* biovariedad *diacetylactis* DB1341.

55 Como medios de crecimiento se usaron: (i) medio M17 (Terzaghi *et al.* 1975); (ii) el medio definido DN tamponado con fosfato DN (Dickely *et al.* 1995) con o sin acetato de sodio (DN o DN-Ac, respectivamente). El medio DN no contiene ácido lipóico, pero fue complementado con Formato de Na a una concentración de 0,6%; y (iii) leche desnatada reconstruida, RSM, conteniendo 9,5% de leche desnatada en polvo con tratamiento térmico de baja temperatura (Milex 240 lh, MD Foods, Dinamarca).

60 Las cepas fueron cultivadas a 30°C y el crecimiento fue controlado midiendo la densidad óptica (OD) a 600 nm y/o pH. Se obtuvieron condiciones anaeróbicas para el crecimiento en placas de agar por incubación en un recipiente sellado usando el sistema Anaerocult® A (Merck, Darmstadt, Alemania). De ahora en adelante, condiciones de crecimiento anaeróbicas para cultivos en medio líquido significa cultivo sin agitación y cultivo aeróbico significa que crece bajo agitación.

##### 65 2. Mutagénesis de *L. lactis*

Una colonia individual de *L. lactis* fue inoculada en 10 ml de medio DN e incubada durante 16 horas bajo agitación vigorosa. Al cultivo crecido se le añadió 150 µl de etil metano sulfonato (EMS, Sigma) y la mezcla fue incubada bajo

## ES 2 285 773 T3

agitación adicional. Después de 2 horas 10 tubos cada uno conteniendo 2 ml de medio DN fueron inoculados cada uno con 0,2 ml del cultivo mutagenizado. Los tubos fueron incubados hasta el día siguiente bajo agitación para la expresión fenotípica. Se añadió glicerol estéril hasta una concentración final de 15% (v/v) y los cultivos fueron almacenados a -70°C hasta su uso.

### 3. Determinación de la actividad de la lactato deshidrogenasa

Una colonia individual de *L. lactis* fue inoculada en 10 ml de medio M17 y cultivada durante toda la noche. Tras el enfriamiento durante 15 min. en hielo, las células fueron cosechadas por centrifugado a 7000 rpm durante 5 min. a 4°C, lavadas en 5 ml de tampón de ensayo Ldh enfriadas en hielo (50 mM de Tris-acetato pH 6,0, 0,5 mM de Fructosa-1,6-difosfato) y resuspendidas en 1 ml de tampón de ensayo de Ldh enfriado en hielo. Las células resuspendidas fueron transferidas a un tubo de vidrio de 5 ml y sometidas a sonicación en hielo usando un Branson Sonifier 250 con los siguientes parámetros: temporizador, 4 min.; ciclo de funcionamiento 25%, salida 4. Después de la sonicación, el contenido del tubo fue transferido a un tubo de Eppendorf enfriado en hielo y centrifugado a 15.000 x g durante 5 min. a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo de Eppendorf enfriado en hielo. La actividad específica de la Ldh del extracto libre de células fue medida a 25°C de la siguiente manera: se añadió 5 µl de extracto libre de células a 495 µl de tampón de ensayo de Ldh conteniendo 0,2 mM de NADH y 25 mM de piruvato. Como control se usó un ensayo sin piruvato. La conversión de NADH a NAD<sup>+</sup> fue seguida espectrofotométricamente durante todo el tiempo a 340 nm usando un espectrofotómetro Spectronic® Genesys 5. Una unidad corresponde a la conversión de 1 µmol de NADH min<sup>-1</sup> ml<sup>-1</sup> de extracto libre de células. La actividad específica es expresada en unidades/mg de proteína. Para medir la concentración de proteína del extracto libre de células se usó el ensayo del ácido Bicinonínico (BCA) (Pierce, Rockford, E.E.U.U.) con albúmina estándar (Pierce) como estándar de proteína.

Ejemplo de referencia 1

#### Necesidad de acetato para el crecimiento de *L. lactis*

Inicialmente se evaluó el crecimiento de las cepas de *L. lactis* subespecie *lactis* 1FHCY-1 y MG1363 en el medio DN con (DN) o sin (DN-Ac) acetato, respectivamente.

Las cepas anteriormente mencionadas fueron colocadas sobre placas de agar con DN y DN-Ac, respectivamente. Las placas fueron incubadas durante 24 horas bajo condiciones anaeróbicas y aeróbicas, respectivamente. Los resultados son resumidos en la Tabla 1 abajo:

TABLA 1

*Necesidad de acetato de 1FHCY-1 y MG1363*

	Aeróbico		Anaeróbico	
	+Ac	-Ac	+Ac	-Ac
1FHCY-1	+++	-	+++	+++
MG1363	+++	-	+++	+++
+++ : tamaño de la colonia 0,5-1 mm;				
- : ningún crecimiento tras incubación prolongada				

Las cepas de *L. lactis* ensayadas tienen una necesidad absoluta de acetato bajo condiciones de crecimiento aeróbicas.

La cepa de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* CHCC373 de tipo salvaje fue seleccionada de la Colección de cultivos de Chr. Hansen A/S, Hørsholm, Dinamarca y se evaluó su necesidad de acetato para el crecimiento bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas respectivamente colocando un cultivo líquido de la cepa sobre una serie de placas con medio DN conteniendo concentraciones cada vez mayores de acetato de sodio en el rango de 0 a 0,2% (p/v).

Se observó poco crecimiento bajo condiciones aeróbicas con 0,01% de acetato de sodio y a 0,02% se observó un crecimiento completo. No se observó ningún crecimiento a concentraciones por debajo de 0,005% de acetato de sodio. Se observó un crecimiento completo bajo condiciones anaeróbicas a 0-0,2% de acetato de sodio.

En los siguientes experimentos, se usó medio DN con 0,1% de acetato de sodio (DN) o sin contener acetato de sodio (DN-Ac).

## ES 2 285 773 T3

### Ejemplo de referencia 2

*Aislamiento de mutantes defectuosos de Pfl de Lactococcus lactis subespecie lactis CHCC373 y Lactococcus lactis subespecie lactis biovariedad diacetilactis DB1341 y su caracterización*

5

#### 2.1. Aislamiento de mutantes

Se prepararon caldos mutagenizados de las cepas CHCC373 y DB1341 del modo descrito anteriormente y se colocaron sobre placas en diluciones sobre placas de agar con medio DN que fueron incubadas aeróbicamente durante 24 a 48 horas. De estas placas 980 colonias de cada cepa fueron seleccionadas y colocadas sobre placas de agar con DN y DN-Ac, respectivamente y estas placas fueron incubadas durante 24 horas bajo condiciones anaeróbicas. Dos cepas designadas DN220 y DN221, respectivamente de la cepa mutagenizada CHCC373 y una cepa designada DN227 de la cepa mutagenizada DB1341 que fueron incapaces de crecer en ausencia de acetato bajo condiciones anaeróbicas fueron seleccionadas.

15

Se aisló ADN cromosómico de DN220, DN221 y CHCC373, respectivamente y se digirió con *EcoRI*, y los patrones del fragmento fueron comparados usando electroforesis en gel de agarosa. Los patrones del fragmento mostraron que ambas DN220 y DN221 fueron originadas de CHCC373. DN221 fue seleccionada para experimentos sucesivos.

20

Una muestra de DN220, DN221 y DN227, respectivamente fue depositada en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania el 26 de junio de 1996 bajo los respectivos números de registro DSM 11033, DSM 11034 y DSM 11040.

25

#### 2.2. Crecimiento de DN221 en medio M17 y RSM

25

CHCC373 y DN221 fueron inoculadas en M17 y los cultivos fueron incubados bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas, respectivamente. Bajo condiciones de crecimiento aeróbicas, DN221 y CHCC373 crecieron igualmente bien como se calculó por OD<sub>600</sub> y el pH. No obstante, el índice de crecimiento de DN221 en M17 bajo condiciones anaeróbicas fue considerablemente inferior al de CHCC373 y declinó a una masa celular inferior. Estos resultados mostraron que la ausencia de acetato en M17 no fue la razón del índice de crecimiento más lento de la cepa mutante seleccionada pero indicó que DN221 carece de una característica esencial necesaria para el crecimiento anaeróbico en comparación con CHCC373. Estos resultados son consistentes con la suposición de que DN221 tiene un defecto en su actividad Pfl dando como resultado una necesidad de acetato y un índice de crecimiento inferior bajo condiciones anaeróbicas en comparación con CHCC373.

35

### Ejemplo de referencia 3

*Aislamiento de mutantes defectuosos de Pfl y Ldh*

40

Un caldo de DN221 fue mutagenizado del modo descrito anteriormente bajo Materiales y Métodos, y las células mutagenizadas fueron colocadas sobre placas en diluciones sobre placas de agar con medio DN que fueron incubadas aeróbicamente durante 24-48 horas. De estas placas se seleccionaron 980 colonias y cada colonia fue colocada sobre dos placas con DN e incubadas 24 horas bajo condiciones anaeróbicas y aeróbicas, respectivamente. Dos cepas (DN222 y DN223) que fueron incapaces de crecer bajo condiciones anaeróbicas fueron seleccionadas.

45

Se aisló ADN cromosómico de DN222, DN223 y CHCC373, respectivamente y se digirió con *EcoRI*. Se compararon los patrones del fragmento usando electroforesis en gel de agarosa. Los patrones del fragmento mostraron que ambas DN222 y DN223 fueron originadas de CHCC373.

50

Una muestra de DN222 y DN223, respectivamente fue depositada en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania el 26 de junio de 1996 bajo los respectivos números de registro DSM 11035 y DSM 11036.

55

### Ejemplo de referencia 4

*Aislamiento de mutantes espontáneos de DN223*

60

Se hizo un cultivo líquido de una colonia individual de DN223 y se incubó bajo condiciones aeróbicas durante toda la noche. Aproximadamente 10<sup>8</sup> células fueron transferidas a placas de agar con medio DN que fueron incubadas bajo condiciones anaeróbicas. Tres cepas designadas DN224, DN225 y DN226 fueron aisladas en base a su capacidad de crecer bajo condiciones anaeróbicas. Las tres cepas eran mutantes o variantes de DN223 habiendo recuperado la capacidad de convertir NADH a NAD<sup>+</sup> bajo condiciones anaeróbicas bien por mutaciones en sistemas secundarios de Ldh y Pfl o por reversión del defecto de Pfl o Ldh.

65

Se aisló ADN cromosómico de DN224, DN225, DN226 y CHCC373, respectivamente y se digirió con *EcoRI*. Los patrones del fragmento fueron comparados usando electroforesis en gel de agarosa. Los modelos del fragmento mostraron que DN224, DN225 y DN226 fueron todos originados de CHCC373.

## ES 2 285 773 T3

Una muestra de DN224, DN225 y DN226, respectivamente fue depositada en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania el 26 de junio de 1996 bajo los respectivos números de registro DSM 11037, DSM 11038 y DSM 11039.

### 5 Ejemplos

#### *Materiales y métodos*

Los siguientes concentrados congelados de cepas bacterianas de ácido láctico fueron usados como organismos auxiliares en todos los ejemplos: cepas de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* DN223 que es defectuosa en piruvato formato liasa (Pfl) y lactato deshidrogenasa (Ldh) y se depositó el 26 de junio de 1996 bajo el número de registro DSM 11036 y DN224 que es defectuosa en Ldh y se depositó el 26 de junio de 1996 bajo el número de registro DSM 11037. Los cultivos fueron producidos según los procedimientos conocidos en la técnica y concentrados 20 veces antes de la congelación. Los recuentos de las células totales del concentrado congelado fueron aproximadamente  $3 \times 10^{11}$  CFU/mL.

#### Ejemplo 1

*El efecto del organismos auxiliar en el índice de acidificación de cultivos iniciadores de productos lácteos mesofílicos en leche poco pasteurizada*

Un concentrado congelado de adición directa (F-DVS del inglés direct vat set) de un cultivo mesofílico comercialmente disponible de Chr. Hansen A/S, Hørsholm, Dinamarca, fue cultivado solo y en asociación con los organismos auxiliares. El cultivo iniciador mesofílico usado fue designado CH-N 19.

CH-N 19 es un cultivo iniciador con un recuento de células totales de al menos  $1 \times 10^{10}$  CFU/g conteniendo una mezcla de *Lactococcus lactis* subespecie *cremoris*, *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subespecie *cremoris* y *Lactococcus lactis* subespecie *diacetilactis*.

CH-N 19 fue usado a un nivel de inoculación de 0,01% en peso. Los organismos auxiliares fueron inoculados a un nivel de 0,001% en peso. Los experimentos fueron realizados en leche entera poco pasteurizada a 30°C con registro de pH a intervalos de 1 h durante 6 horas.

El desarrollo del pH en leche entera poco pasteurizada inoculada con CH-N 19 solo y CH-N 19 en asociación con DN223 y DN224, respectivamente, es mostrado en la Tabla 1.1 abajo.

TABLA 1.1

*El desarrollo del pH en leche inoculada con CH-N 19 solo y en asociación con DN223 y DN224*

Horas desde la inoculación	pH		
	CH-N 19	CH-N 19 + DN223	CH-N 19 + DN224
3	6,53	6,52	6,51
4	6,40	6,36	6,37
5	6,16	6,04	6,02
6	5,80	5,64	5,60

Cuando se cultivó en asociación con este cultivo mesofílico el efecto de los organismos auxiliares DN223 y DN224 en el índice de acidificación después de 5 horas de cultivo fue un  $\Delta$ pH de 0,12 y 0,14, respectivamente. El efecto de los organismos auxiliares fue adicionalmente aumentado después de 6 horas de cultivo a un  $\Delta$ pH de 0,16 y 0,20 unidades de pH, respectivamente, es decir se alcanzó un pH 5,8 24 y 26 minutos más rápido cuando se cultivó CH-N 19 en asociación con DN223 y DN224, respectivamente, que cuando se cultivó solo.

De estos resultados es evidente que el índice de acidificación de los cultivos para productos lácteos mesofílicos puede ser mejorado por cultivo en asociación con organismos auxiliares tales como DN223 y DN224, los organismos auxiliares siendo usados en una concentración de aproximadamente  $3 \times 10^6$  CFU/g de leche y el cultivo mesofílico siendo usado a una concentración de aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU/g de leche. Se observó un efecto mayor en el aumento del índice de acidificación con DN224 en comparación con DN223 bajo condiciones experimentales equivalentes.

## ES 2 285 773 T3

### Ejemplo 2

*El efecto de organismos auxiliares en el índice de acidificación de cultivos iniciadores bacterianos de ácido láctico termofílicos*

5

Tres concentrados F-DVS de cultivos iniciadores bacterianos de ácido láctico termofílicos comercialmente disponibles de Chr. Hansen fueron cultivados solos (control negativo) y en asociación con DN223 y DN224, respectivamente. Los cultivos termofílicos usados son designados TCC-20, YC-460 y YC-470, respectivamente.

10

TCC-20 es un cultivo iniciador termofílico con un recuento de células totales de al menos  $1 \times 10^{10}$  CFU/g conteniendo *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus helveticus*. El cultivo es principalmente aplicado en la producción de queso, p. ej. tipos de queso suizo, tipos de queso italiano, tipos de queso Mozzarella y para pizza.

15

YC-460 y YC-470 son ambos cultivos de cepas mezcladas conteniendo *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*. Los cultivos son principalmente usados en la producción de yogur. Ambos cultivos dan un alto nivel de sabor al yogur y YC-460 produce una viscosidad del medio y YC-470 produce una alta viscosidad del yogur.

20

El cultivo TCC-20 fue usado a un nivel de inoculación de 0,01% en peso y a una temperatura de 37°C. YC-460 y YC-470 fueron usados a un nivel de inoculación de 0,02% en peso y a una temperatura de 43°C. Los organismos auxiliares fueron inoculados a un nivel de 0,001% en peso. La proporción del peso entre los cultivos iniciadores y DN223 y DN224, respectivamente, fue 1:10 en el caso de TCC-20 y 1:20 en el caso de los cultivos de yogur. Todos los experimentos fueron realizados en 200 ml de leche entera poco pasteurizada con registro del pH durante 5 horas a intervalos de 1 hora.

25

#### 2.1 Resultados obtenidos con el cultivo para productos lácteos TCC-20

30

La acidificación de leche entera poco pasteurizada inoculada con TCC-20 solo y en asociación con DN223 y DN224, respectivamente, es mostrada en la Tabla 2.1 abajo.

35

TABLA 2.1

*El desarrollo del pH en leche inoculada con TCC-20 solo ven asociación con DN223 y DN224, respectivamente*

40

Horas tras la inoculación	pH		
	TCC-20	TCC-20 + DN223	TCC-20 + DN224
2	6,50	6,52	6,51
3	6,53	6,48	6,47
4	6,28	6,08	5,95
5	6,15	5,48	5,34

50

55

Después de sólo 4 horas los resultados de cultivar TCC-20 en asociación con DN223 y DN224, respectivamente, fue un  $\Delta$ pH de 0,20 y 0,33, respectivamente. Después de 5 horas de cultivo el efecto de DN223 y DN224 ha aumentado a un  $\Delta$ pH de 0,67 y 0,81, respectivamente. Se alcanzó un pH de 6,2 en la leche 55 y 66 minutos más rápido cuando el cultivo TCC-20 fue inoculado en asociación con DN223 y DN224, respectivamente, que cuando fue cultivado solo.

60

#### 2.2 Resultados obtenidos con el cultivo iniciador de productos lácteos YC-470

65

El desarrollo del pH en leche como resultado de cultivar YC-470 solo y en asociación con DN223 y DN224, respectivamente, es mostrado en la Tabla 2.2.

65

## ES 2 285 773 T3

TABLA 2.2

*El desarrollo del pH en leche inoculada con YC-470 solo y en asociación con DN223 y DN224, respectivamente*

Horas tras la inoculación	pH		
	YC-470	YC-470 + DN223	YC-470 + DN224
1	6,50	6,50	6,51
2	6,38	6,35	6,34
3	6,32	6,03	6,00
4	5,94	5,11	5,06
5	5,47	4,51	4,46

También este cultivo se benefició significativamente de la presencia de DN223 y DN224. El índice de acidificación después de 3 horas fue aumentado con un  $\Delta$ pH de 0,29 y 0,32, respectivamente, después de 4 horas con un  $\Delta$ pH de 0,83 y 0,88, respectivamente, y más después de 5 horas con un  $\Delta$ pH de 0,96 y 1,01.

El aumento en el índice de acidificación, expresado como la reducción de tiempo requerido para que el cultivo YC-470 acidifique la leche a un pH 6,0 fue 49 y 51 minutos, respectivamente, cuando el cultivo YC-470 fue inoculado en asociación con DN223 y DN224, respectivamente, en comparación a cuando fue cultivado solo.

### *2.3 Resultados obtenidos con el cultivo iniciador de productos lácteos YC-460*

El desarrollo del pH en leche inoculada con YC-460 solo y en asociación con DN223 y DN224, respectivamente, es mostrado en la Tabla 2.3 abajo.

TABLA 2.3

*El desarrollo del pH en leche inoculada con YC-460 solo y en asociación con DN223 y DN224, respectivamente*

Horas tras la inoculación	pH		
	YC-460	YC-460 + DN223	YC-460 + DN224
1	6,53	6,52	6,52
2	6,43	6,42	6,42
3	6,43	6,18	6,12
4	6,14	5,23	5,14
5	5,87	4,53	4,45

Quando se cultiva en asociación con los organismos auxiliares DN223 y DN224 se observa un efecto en el índice de acidificación tan pronto como después de 3 horas de cultivo con un  $\Delta$ pH de 0,25 y 0,31, respectivamente. Se observó un efecto más significativo de cultivar YC-460 en asociación con los organismos auxiliares DN223 y DN224, respectivamente, después de 4 horas con un  $\Delta$ pH de 0,91 y 1,00, respectivamente. Se observó otro efecto mayor después de 5 horas con un  $\Delta$ pH de 1,34 y 1,42 para DN223 y DN224, respectivamente.

El aumento en el índice de acidificación, expresado como la reducción de tiempo requerido para que el cultivo YC-460 acidifique la leche a un pH 6,0 fue 78 y 83 minutos, respectivamente, cuando el cultivo YC-460 fue cultivado en combinación con DN223 y DN224, respectivamente, en comparación con los cultivos que son cultivados sin organismos auxiliares.

## ES 2 285 773 T3

Como con los cultivos mesofílicos, se observó un efecto mayor cultivando los cultivos iniciadores termofílicos en asociación con DN224 mejor que con DN223. La diferencia entre los dos organismos auxiliares no fue tan pronunciada cuando se usó en asociación con cultivos termofílicos. El efecto de los organismos auxiliares medido por el mayor índice de acidificación fue significativamente superior cuando se usó en asociación con cultivos termofílicos. De los cultivos evaluados el crecimiento asociativo con DN223 y DN224, respectivamente, fue el de mayor beneficio para los cultivos del yogur YC- 460 y YC-470, el aumento del índice de acidificación después de 5 horas siendo aproximadamente 1 unidad de pH con una proporción de peso de 1:20 entre los cultivos del yogur y DN223 y DN224, respectivamente. Los dos organismos auxiliares fueron capaces de reducir significativamente el tiempo requerido para acidificar la leche a un determinado pH cuando se inoculó a un nivel de 0,001% en peso del sustrato.

### Ejemplo 3

*El efecto de añadir organismos auxiliares en el índice de acidificación de un cultivo iniciador bacteriano de ácido láctico conteniendo ambas cepas mesofílica y termofílica*

Se determinó el efecto de los organismos auxiliares DN223 y DN224 en el índice de acidificación en la leche para los cultivos iniciadores mezclados destinados a la producción de queso holandés y continental. Estos cultivos iniciadores mezclados contienen cepas bacterianas de ácido láctico mesofílica y termofílica. Los cultivos iniciadores fueron inoculados como DVS congelados. Se usaron los siguientes cultivos iniciadores:

YY-62 y YY-63 son cultivos iniciadores que consisten en una mezcla de ambas cepas bacterianas de ácido láctico mesofílica y termofílica.

TH4 es un cultivo iniciador comercial que contiene una cepa bacteriana de ácido láctico termofílica.

B-11 es un cultivo iniciador mesofílico comercial mezclado que contiene cepas de *Lactococcus lactis* subespecie *cremoris*, *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subespecie *cremoris* y *Lactococcus lactis* subespecie *diacetylactis*. El cultivo tiene un recuento de células totales de al menos  $1 \times 10^{10}$  CFU/g. El cultivo iniciador tiene un contenido de *Leuconostoc mesenteroides* subespecie *cremoris* en el rango de 1-5% en base al recuento de células totales y de *Lactococcus lactis* subespecie *diacetylactis* en el rango de 5-30% en base al recuento de células totales.

La evaluación del índice de acidificación se realizó por inoculación de los cultivos iniciadores en leche pasteurizada entera. La temperatura fue controlada por un controlador de temperatura automático, generando un perfil de temperatura del queso Danbo típico. Los cultivos iniciadores fueron incubados en los niveles indicados en las tablas abajo. La leche fue almacenada durante toda la noche a 4-7°C en botellas con los tapones sueltos, para asegurar el mismo nivel de saturación de oxígeno en todas las botellas.

El desarrollo del pH fue medido casi continuamente durante las 16 horas de incubación por el hardware AAC de Intab A/B. Las curvas de acidificación fueron generadas por el paquete de software Easyview versión 3.2.0.4. Los valores de pH medidos después de 5 y 6 horas de incubación son mostrados en las tablas abajo.

#### 3.1 El efecto de añadir organismos auxiliares DN223 o DN224 al cultivo iniciador YY-62

El nivel de inoculación del cultivo iniciador YY-62 y/u organismos auxiliares DN223 y DN224 es mostrado en la Tabla 3.1:

TABLA 3.1

*Nivel de inoculación (% en peso de leche) de YY-62, DN223 y DN224*

Cultivo	Cultivo	DN223/ DN224	Total inoc.
YY-62	0,0034%	0%	0,0034%
YY-62 + DN223	0,00331%	0,0014%	0,0048%
YY-62 + DN224	0,00338%	0,0015%	0,0049%

El pH después de 5 y 6 horas en leche pasteurizada entera inoculada con el cultivo iniciador solo y en asociación con los organismos auxiliares DN223 y DN224, respectivamente, es mostrado en la Tabla 3.2:

## ES 2 285 773 T3

TABLA 3.2

*pH después de 5 y 6 horas en leche pasteurizada entera inoculada con YY-62 solo o en asociación con DN223 y DN224*

Cultivo	Unidad	5 horas	6 horas
YY-62	pH	6,35	6,24
YY-62 + DN223	pH	6,19	6,01
YY-62 + DN224	pH	6,13	5,94
Temp. botella	°C	31,18	26,2

### 3.2 El efecto de añadir DN223 o DN224 al cultivo iniciador YY-63

El nivel de inoculación del cultivo iniciador YY-63 con o sin los organismos auxiliares DN223 o DN224 es mostrado en la Tabla 3.3:

TABLA 3.3

*Nivel de inoculación (% en peso de leche) de YY-63, DN223 y DN224*

Cultivo	Cultivo	DN223/ DN224	Total inoc.
YY-63	0,0034%	0%	0,0034%
YY-63 + DN223	0,00337%	0,0017%	0,0051%
YY-63 + DN224	0,00347%	0,0015 %	0,0050%

El pH después de 5 y 6 horas en leche pasteurizada entera inoculada con el cultivo iniciador solo y en asociación con los organismos auxiliares DN223 y DN224, respectivamente, es mostrado en la Tabla 3.4:

TABLA 3.4

*pH después de 5 y 6 horas en leche pasteurizada entera inoculada con YY-62 solo o en asociación con DN223 o DN224*

Cultivos	Unidad	5 horas	6 horas
YY-63	pH	6,26	6,10
YY-63 + DN223	pH	6,04	5,75
YY-63 + DN224	pH	6,07	5,80
Temp. botella	°C	31,05	26,06

### 3.3 El efecto de añadir organismos auxiliares DN223 o DN224 al cultivo iniciador YY-43, una mezcla de cultivo iniciador B-11 y cultivo iniciador TH4

El nivel de inoculación del cultivo iniciador YY-43, que es un cultivo iniciador mixto conteniendo el cultivo iniciador B-11 y el cultivo iniciador TH4, y/u organismos auxiliares DN223 y DN224 es mostrado en la Tabla 3.5:

## ES 2 285 773 T3

TABLA 3.5

*Nivel de inoculación (% en peso de leche) de YY-43, DN223 y DN224*

Cultivo	Cultivo	DN223/ DN224	Total inoc.
YY-43	0,0036%	0%	0,0036%
YY-43 + DN223	0,00345%	0,0015%	0,0050%
YY-43 + DN224	0,0034%	0,0014%	0,0049%

El pH después de 5 y 6 horas en leche pasteurizada entera inoculada con el cultivo iniciador solo y en asociación con los organismos auxiliares DN223 y DN224, respectivamente, es mostrado en la Tabla 3.6:

TABLA 3.6

*pH después de 5 y 6 horas en leche pasteurizada entera inoculada con YY-62 solo o en asociación con DN223 y DN224*

Cultivo	Unidad	5 horas	6 horas
YY-43	pH	6,17	5,97
YY-43 + DN223	pH	6,03	5,78
YY-43 + DN224	pH	6,03	5,81
Temp.	°C	30,85	25,83

### 3.6 Conclusiones

Se ha demostrado un efecto marcado de la adición de organismos auxiliares según la invención en el índice de acidificación de tres cultivos iniciadores bacterianos de ácido láctico diferentes (3.1, 3.2 y 3.3). Así, después de 6 horas el pH fue reducido en 0,19-0,35 unidades de pH para los cultivos iniciadores YY-62, YY-63 y YY-43. Este aumento del índice de acidificación de los cultivos iniciadores implica que una acidificación deseada de leche puede ser obtenida usando el 50% del nivel normal de cultivo iniciador para conseguir la acidificación equivalente cuando este nivel reducido de cultivo iniciador es complementado con un organismo auxiliar de la invención.

#### Ejemplo 4

##### *Respuesta de la dosificación de los organismos auxiliares*

##### *4.1 Efecto de aumentar la dosificación de organismos auxiliares en la acidificación de B-11 en diferentes sustratos de leche*

El efecto de aumentar la cantidad de organismo auxiliar en el índice de acidificación de un cultivo iniciador de productos lácteos fue evaluado usando el cultivo mesofílico designado B-11 cultivado en asociación con DN223 y DN224, respectivamente.

B-11 es un cultivo iniciador mesofílico como se describe en el Ejemplo 3.

Se usaron tres sustratos: leche entera poco pasteurizada, leche entera ecológica poco pasteurizada y leche desnatada muy pasteurizada. El nivel de inoculación del cultivo B-11 fue 0,01% en peso. Los organismos auxiliares fueron evaluados a 4 niveles de inoculación diferentes: 0% en peso; 0,005% en peso; 0,01% en peso y 0,02% en peso, respectivamente. Todos los experimentos fueron realizados a 30°C y el pH del sustrato fue medido después de 5 horas de incubación.

## ES 2 285 773 T3

Los resultados para cada uno de los sustratos anteriores son mostrados en las Figs. 1, 2 y 3, respectivamente. Los tres experimentos mostraron que la acidificación de los sustratos fue mejorada significativamente cuando B-11 fue cultivado en asociación con DN223 y DN224, respectivamente, el efecto de DN224 en general siendo mejor que aquel de DN223. Solo se observaron pequeñas desviaciones en el efecto entre los sustratos de leche diferentes. En la leche entera hubo una reducción grande del pH de 5,97 a 5,58 y 5,55 cuando B-11 fue cultivado en asociación con 0,005% en peso de DN223 y DN-224, respectivamente. La reducción del pH mejoró adicionalmente cuando se usó DN223 y DN224 a un nivel de inoculación de 0,01% en peso dando como resultado un pH de 5,53 y 5,48, respectivamente. Cuando el nivel de inoculación del organismo auxiliar fue aumentado a 0,02% en peso no se observó un mayor aumento en el índice de acidificación.

Cuando el cultivo iniciador B-11 fue inoculado a 0,01% en peso y cultivado en asociación con DN223 y DN224, respectivamente, se consiguió un efecto mayor con una cantidad de organismo auxiliar de aproximadamente 0,005% en peso, el efecto dependiendo sólo en menor medida del sustrato de leche.

### 4.2 El efecto de aumentar la dosificación de organismos auxiliares en el índice de acidificación de YC-460 en leche pasteurizada entera

El desarrollo de pH en 1000 ml de leche entera poco pasteurizada inoculada con 0,02% en peso de YC-460, 0,003% en peso de DN223 y 0,02% en peso de YC-460 en asociación con 0,003% en peso de DN223 es mostrado en la Fig. 4. Los resultados correspondientes obtenidos con el organismo auxiliar DN224 son mostrados en la Fig. 5.

El tiempo usado para acidificar la leche a pH 6,0 fue reducido en aproximadamente 92 y 96 minutos cuando se cultivó YC-460 en asociación con DN223 y DN224, respectivamente, en comparación con ser cultivado solo.

En comparación con los resultados obtenidos en el Ejemplo 2.3 se observó un aumento en el índice de acidificación cuando el nivel de inoculación del organismo auxiliar fue aumentado de 0,001% en peso a 0,003% en peso. El tiempo requerido por el cultivo YC-460 para acidificar la leche a pH 6,0 fue adicionalmente reducido en 13-14 minutos cuando la cantidad de organismo auxiliar fue aumentado de 0,001% en peso a 0,003% en peso.

Se alcanzó un pH de 4,5 en la leche después de 6 horas y 52 minutos cuando la leche fue inoculada con YC-460 solo y después de 4 horas y 44 minutos y 4 horas y 45 minutos inoculada con YC-460 en asociación con DN223 y DN224, respectivamente.

### Ejemplo 5

#### *El efecto de DN223 y DN224 en la concentración de oxígeno en la leche en relación con el índice de acidificación de los cultivos iniciadores*

Se controló el desarrollo del pH y la concentración de oxígeno cultivando leche con cultivos iniciadores de ambos tipos mesofílico y termofílico y con los cultivos iniciadores en asociación con DN223 y DN224, respectivamente. El pH fue medido usando un amplificador de pH Chemap y un electrodo Mettler Toledo HA 465-50-T-S-7 y la concentración de oxígeno fue medida usando un amplificador de O<sub>2</sub> Chemap y un electrodo pO<sub>2</sub> Ingold. Como controles negativos se inoculó leche con DN223 y DN224, respectivamente. Los cultivos fueron realizados en fermentadores de 40 litros con mezcla moderada y usando 30 litros de leche entera ecológica poco pasteurizada como sustrato.

Se realizaron cuatro grupos de experimentos en 3 fermentadores paralelos con las adiciones siguientes de cultivo iniciador y/u organismos auxiliares:

Experimento A: i) 0,02% en peso de YC-460,  
ii) 0,003% en peso de DN223 y  
iii) 0,02% en peso de YC-460 en asociación con 0,003% en peso de DN223.

i) 0,02% en peso de YC-460,  
ii) 0,003% en peso de DN224 y  
iii) 0,02% en peso de YC-460 en asociación con 0,003% en peso de DN224.

Experimento C: i) 0,01% en peso de B-11,  
ii) 0,0015% en peso de DN223 y  
iii) 0,01% en peso de B-11 en asociación con 0,0015% en peso de DN223.

## ES 2 285 773 T3

- Experimento D:
- i) 0,01% en peso de B-11,
  - ii) 0,0015% en peso de DN224 y
  - iii) 0,01% en peso de B-11 en asociación con 0,0015% en peso de DN224.

La temperatura fue mantenida a 43°C cuando se cultivó el cultivo termofílico YC-460 y a 30°C cuando se cultivó el cultivo mesofílico B-11. El pH y la concentración de oxígeno fueron medidos y registrados a intervalos de media hora.

Los resultados obtenidos en el experimento A son mostrados en las Figs. 6A y 6B, respectivamente, y los resultados obtenidos en el experimento B son mostrados en las Figs. 7A y 7B, respectivamente.

De las Figuras 6A y 6B se puede observar que cuando YC-460 fue cultivado solo, el oxígeno fue consumido a una velocidad lenta dando como resultado un medio libre de oxígeno después de 4,5 horas. La acidificación de la leche fue muy limitada cuando el contenido de oxígeno de la leche fue alto y se alcanzó el pH 6 después de 4 horas.

La inoculación de la leche con DN223 produjo una reducción rápida del contenido de oxígeno de la leche, el oxígeno siendo totalmente eliminado después de 2,5 horas. Sustancialmente no se observó ninguna acidificación de la leche bajo estas condiciones.

La inoculación de la leche con YC-460 en asociación con DN223 produjo una reducción rápida de la concentración de oxígeno en la leche, el oxígeno siendo totalmente eliminado después de 2,5 horas. El índice de acidificación de la leche fue lento a concentraciones de oxígeno alto en la leche, pero acelerado a un punto anterior que cuando YC-460 fue inoculado solo, es decir, el pH estaba por debajo de 6 después de sólo 2,5 horas.

Cuando se compara con los resultados correspondientes mostrados en las Figs. 6A y 6B es evidente que la acidificación de la leche por YC-460 estaba correlacionada a la concentración de oxígeno. El cultivo iniciador YC-460 fue capaz de eliminar el oxígeno del medio por sí mismo pero lo hizo lentamente. Cuando el contenido de oxígeno estuvo en el rango de 0-3 ppm la acidificación del medio por YC-460 fue significativa. La presencia de DN223 en asociación con YC-460 mejoró la eliminación de oxígeno y de ese modo disminuyó el tiempo hasta la aparición de la acidificación. La aparición más rápida de acidificación no fue debida a la acidificación del medio por DN223. Cuando el contenido de oxígeno estuvo en el rango de 0-3 ppm la acidificación del medio por YC-460 fue significativa. La presencia de DN223 en asociación con YC-460 mejoró la eliminación de oxígeno y de ese modo disminuyó el tiempo hasta la aparición de la acidificación. La aparición más rápida de acidificación no fue debida a la acidificación del medio por DN223. La presencia de DN223 en asociación con YC-460 aumentó la eliminación de oxígeno y de ese modo disminuyó el tiempo hasta la aparición de la acidificación. La aparición más rápida de acidificación no fue debida a la acidificación del medio por DN223.

Se obtuvieron resultados similares con cultivo asociativo de YC-460 y DN224, mostrado en las Figs. 7A y 7B. La inoculación de la leche con DN224 solo, produjo un rápido descenso del contenido de oxígeno de la leche, el medio estando libre de oxígeno después de sólo 1,5 horas. Sustancialmente no se observó ninguna acidificación de la leche.

La acidificación de la leche por YC-460 produjo un pH de aproximadamente 6 a las 4,5-5 horas y este pH se obtuvo con el cultivo asociativo de YC-460 y DN224 después de aproximadamente sólo 3 horas.

Aún así DN224 elimina el oxígeno en el medio más rápidamente que lo hace DN223 el índice de acidificación mejorado de YC-460 en asociación con DN224 fue esencialmente el mismo que el obtenido con DN223. Esto indica que la concentración de oxígeno en el medio es un factor con un efecto en la acidificación de leche por cultivos termofílicos.

Los resultados del experimento C son mostrados en las Figs. 8A y 8B, y los resultados del experimento D son mostrados en las Fig. 9A y 9B.

De las figuras se puede observar que la inoculación de leche con 0,0015% en peso de DN223 y DN224 hizo que el oxígeno fuera totalmente eliminado después de 2,5 horas para ambos organismos auxiliares. Esto corresponde con los resultados obtenidos cuando la leche fue inoculada con 0,003% en peso de DN223. Después de 2 horas de incubación el nivel mayor de inoculación de DN223 redujo la concentración de oxígeno en aproximadamente 2 ppm mientras que el nivel inferior de inoculación de ambos DN223 y DN224 produjo un nivel de oxígeno de aproximadamente 3 ppm. Con 0,003% en peso de DN224 el oxígeno fue totalmente eliminado después de 2 horas de incubación y después de 1,5 horas la concentración de oxígeno fue aproximadamente 2,5 ppm.

Los resultados del cultivo asociativo de B-11 con DN223 y DN224, respectivamente, muestra que el índice de acidificación de este cultivo fue mejorado por la presencia de los organismos auxiliares. Los índices de acidificación mejorados fueron casi los mismos cuando se usa DN223 y DN224. Los valores de pH de 5,88 y 5,97 obtenidos después de 5 horas de incubación con B-11 en asociación con DN223 y DN224, respectivamente, pueden ser obtenidos en comparación con 5,58 y 5,54 en el ejemplo 3 con 0,005% en peso de DN223 y DN224, respectivamente. El efecto de

## ES 2 285 773 T3

aumentar la cantidad de organismo auxiliar de 0,0015% en peso a 0,005% en peso es así una reducción del pH después de 5 horas de 5,88 a 5,58 con DN223 y de 5,97 a 5,54 con DN224.

5 De la Fig. 8A se puede observar que se alcanzó un pH de 5,2 en la leche después de 7 horas y 24 minutos cuando la leche fue inoculada con B-11 solo y después de 6 horas y 22 minutos inoculada con B-11 y DN223 en asociación. De la Fig. 9A se puede observar que se alcanzó un pH 5,2 después de 7 horas y 48 minutos cuando la leche fue inoculada con B-11 solo y después de 6 horas y 39 minutos inoculada con B-11 en asociación con DN224.

### Referencias

10

1. **Condon, S.** 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Review*, 46, 269-280.

15

2. **Dickely, F., Nilsson, D., Hansen, E.B. y Johansen, E.** 1995. Isolation of *Lactococcus lactis* nonsense suppressors and construction of a food-grade cloning vector. *Molec. Microbiol.*, 15, 839-847.

20

3. **Rajagopal, S.N. y Sandine, W.E.** 1990. Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk. *J. Dairy Sci.*, 73, 894-899.

4. **Suzuki, I., Kato, S., Kitada, T., Yano, N. y Morichi, T.** 1986. Growth of *Lactobacillus bulgaricus* in milk. 1. Cell elongation and the role of formic acid in boiled milk. *J. Dairy Sci.*, 69, 311-320.

25

5. **Terzaghi, B.E y Sandine, W.E.** 1975. Improved medium for the lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.*, 29, 807-813.

(Formulario pasa a página siguiente)

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 285 773 T3

Número de referencia del expediente del solicitante o agente	19565 PC 1	Nº de Solicitud Internacional	PCT/DK/98/00210
--	------------	-------------------------------	-----------------

INDICACIONES REFERENTES A UN MICROORGANISMO DEPOSITADO  
(Regla 13bis PCT)

A. Las indicaciones indicadas abajo se refieren al microorganismo al que se hace referencia en la descripción en la página 22 línea 11	
B. IDENTIFICACION DEL DEPOSITO Otros depósitos identificados en hojas adicionales X	
Nombre de la institución depositaria DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Cellkulturen GmbH	
Dirección de la de la institución depositaria (incluidos código postal y país) Mascheroder Weg 1B D-38124 Braunschweig Alemania	
Fecha de depósito	Número de registro
26 de junio de 1996	DSM11035
C. INDICACIONES ADICIONALES (déjese en blanco si no fuera aplicable) Esta información continúa en hoja aparte X	
En cuanto a las Oficinas de patentes respectivas de los respectivos estados designados, los solicitantes piden que una muestra de los microorganismos depositados declarados arriba sólo sea hecha disponible para un experto nombrado por el solicitante hasta la fecha en la que la patente sea concedida o la fecha en la que la solicitud sea rechazada o retirada o considerada retirada	
D. ESTADOS DESIGNADOS INDICADOS (en caso de no indicarse todos los estados designados)	
E. PRESENTACION SEPARADA DE INDICACIONES (déjese en blanco si no fuera aplicable) Las indicaciones relacionadas abajo serán presentadas a la Oficina Internacional más tarde (especifíquese la naturaleza general de las indicaciones p. ej., Número de Registro del Depósito")	
Sólo para uso de la Oficina Receptora	Sólo para uso de la Oficina Internacional
X Esta hoja fue recibida con la solicitud internacional	Esta hoja fue recibida por la Oficina Internacional el:
Oficial autorizado (consta firma ilegible)	Oficial autorizado

Formulario PCT/RO/134 (Julio 1992)

INDICACIONES REFERENTES A MICROORGANISMOS DEPOSITADOS (Regla 12bis PCT)

## ES 2 285 773 T3

### *Hoja adicional*

Además del microorganismo indicado en la página 38 de la descripción, se depositaron los siguientes microorganismos en

5 DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Cellkulturen GmbH Mascheroder Weg 1B, D-38124 Braunschweig, Alemania

10 en las fechas y según los números de registro indicados abajo:

Número de registro	Fecha de depósito	Descripción N° Página	Descripción N° Línea
15 DSM 11033	26 de junio de 1996	21	6
DSM 11034	26 de junio de 1996	21	6
20 DSM 11036	26 de junio de 1996	22	11
DSM 11037	26 de junio de 1996	23	3
DSM 11038	26 de junio de 1996	23	3
25 DSM 11039	26 de junio de 1996	23	3
DSM 11040	26 de junio de 1996	21	6

30 Para todos los microorganismos arriba identificados depositados, se aplican las indicaciones adicionales siguientes:

35 En cuanto a las Oficinas de patentes respectivas de los respectivos estados designados, los solicitantes piden que una muestra de los microorganismos depositados declarados arriba sólo sea hecha disponible para un experto nombrado por el solicitante hasta la fecha en la que la patente sea concedida o la fecha en la que la solicitud sea rechazada o retirada o considerada retirada.

## ES 2 285 773 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para aumentar el índice de crecimiento y/o controlar la actividad metabólica de una cepa bacteriana de ácido láctico, comprendiendo cultivar la cepa en asociación con un organismo auxiliar bacteriano de ácido láctico, donde dicho organismo auxiliar bacteriano de ácido láctico es defectuoso en su metabolismo pirúvico.
- 10 2. Método según la reivindicación 1 donde la actividad metabólica de la cepa bacteriana de ácido láctico que conduce a un aumento de la producción de ácidos es aumentada.
- 15 3. Método según la reivindicación 2 donde la mayor producción de ácido corresponde a un  $\Delta$ pH de al menos 0,05 después de 3 horas o más de cultivo.
- 20 4. Método según la reivindicación 1 donde la cepa es cultivada en un medio con un grado inicial de saturación de oxígeno que es del 10% o superior.
- 25 5. Método según la reivindicación 4 donde el medio tiene un grado inicial de saturación de oxígeno que es del 20% o superior.
- 30 6. Método según la reivindicación 1 donde la cantidad de oxígeno presente en el medio en el que la cepa bacteriana de ácido láctico y el organismo auxiliar son cultivados, es reducido en al menos 1% por hora.
- 35 7. Método según la reivindicación 1, donde el organismo auxiliar es un derivado de una bacteria de ácido láctico.
- 40 8. Método según la reivindicación 7 donde el organismo auxiliar esencialmente no produce ácido láctico.
- 45 9. Método según la reivindicación 1 donde el organismo auxiliar es defectuoso en su capacidad para expresar al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en piruvato formato liasa, piruvato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, acetolactato sintetasa, acetolactato sintetasa secundario, acetolactato decarboxilasa y diacetil reductasa.
- 50 10. Método según la reivindicación 9 donde el organismo auxiliar es una cepa de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* DN223 depositada bajo el número de registro DSM 11036.
- 55 11. Método según la reivindicación 9 donde el organismo auxiliar es una cepa de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* DN224 depositada bajo el número de registro DSM 11037.
- 60 12. Método según la reivindicación 1, donde la cepa bacteriana de ácido láctico es cultivada en un medio que es seleccionado del grupo que consiste en leche, carne, masa de harina, vino y un material vegetal.
- 65 13. Método según la reivindicación 1 donde la proporción entre células del organismo auxiliar y células de la cepa bacteriana de ácido láctico está en el rango de 1000:1 a 1:1000.
- 70 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-13 donde un gen de codificación de una enzima que es capaz de catalizar la reducción de O<sub>2</sub> es sobreexpresado en el organismo auxiliar.
- 75 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 donde un gen de codificación de una enzima que es capaz de catalizar la reducción de O<sub>2</sub> y regenerar NAD<sup>+</sup> es sobreexpresado en el organismo auxiliar.
- 80 16. Método según la reivindicación 15 donde la enzima cataliza la reducción de O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- 85 17. Método según la reivindicación 16 donde la enzima es NADH:H<sub>2</sub>O oxidasa incluyendo la enzima que tiene la SEC ID NO:2.
- 90 18. Método según la reivindicación 14 donde el organismo auxiliar es una cepa Ldh<sup>-</sup>.
- 95 19. Composición de cultivo iniciador que comprende una bacteria de ácido láctico y un organismo auxiliar de ácido láctico, donde dicho organismo auxiliar de ácido láctico es defectuoso en su metabolismo pirúvico.
- 100 20. Composición según la reivindicación 19 donde el organismo auxiliar esencialmente no produce ácido láctico.
- 105 21. Composición según la reivindicación 19 o 20 donde el organismo auxiliar es defectuoso en su capacidad para producir al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en piruvato formato liasa, piruvato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, acetolactato sintetasa, acetolactato sintetasa secundario, acetolactato decarboxilasa y diacetil reductasa.
- 110 22. Composición según la reivindicación 19 donde el organismo auxiliar es una cepa de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* DN223 depositada bajo el número de registro DSM 11036.

## ES 2 285 773 T3

23. Composición según la reivindicación 19 donde el organismo auxiliar es una cepa de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* DN224 depositada bajo el número de registro DSM 11037.
- 5 24. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 19-23 donde un gen de codificación de una enzima que es capaz de catalizar la reducción de O<sub>2</sub> es sobreexpresado en el organismo auxiliar.
25. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 24 donde un gen de codificación de una enzima que es capaz de catalizar la reducción de O<sub>2</sub> y regenerar NAD<sup>+</sup> es sobreexpresado en el organismo auxiliar.
- 10 26. Composición según la reivindicación 25 donde la enzima cataliza la reducción de O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
27. Composición según la reivindicación 26 donde la enzima es NADH:H<sub>2</sub>O oxidasa incluyendo la enzima que tiene la SEC ID NO:2.
- 15 28. Composición según la reivindicación 24 donde el organismo auxiliar es una cepa Ldh<sup>-</sup>.
29. Composición según la reivindicación 19 que comprende dos o más cepas bacterianas de ácido láctico diferentes.
30. Bacteria de ácido láctico que es defectuosa en al menos una enzima implicada en el metabolismo pirúvico y en la cual un gen de codificación de una enzima que es capaz de catalizar la reducción de O<sub>2</sub> es sobreexpresado.
- 20 31. Bacteria según la reivindicación 30 que es defectuosa en al menos una enzima implicada en el metabolismo pirúvico y en la cual un gen de codificación de una enzima que es capaz de catalizar la reducción de O<sub>2</sub> y regenerar NAD<sup>+</sup> es sobreexpresado.
- 25 32. Bacteria según la reivindicación 31 donde el gen de codificación de una enzima que es capaz de regenerar NAD<sup>+</sup> que es sobreexpresado codifica una enzima que cataliza la reducción de O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- 30 33. Bacteria según la reivindicación 32 donde la enzima es NADH:H<sub>2</sub>O oxidasa incluyendo la enzima que tiene la SEC ID NO:2.
34. Bacteria según la reivindicación 30 que es defectuosa en su capacidad para expresar al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en piruvato formato liasa, piruvato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, acetolactato sintetasa, acetolactato sintetasa secundario, acetolactato decarboxilasa y diacetil reductasa.
- 35 35. Bacteria según la reivindicación 30 que comprende un fragmento de ADN aislado derivado de una bacteria de ácido láctico, dicho fragmento de ADN comprendiendo un gen de codificación para un polipéptido que tiene actividad NADH:H<sub>2</sub>O oxidasa.
- 40 36. Bacteria según la reivindicación 35 donde el fragmento de ADN es seleccionado del grupo que consiste en la secuencia mostrada en la SEC ID NO:1 y una variante o derivado de esta que es al menos 50% idéntico a dicha secuencia, y tiene la misma función.

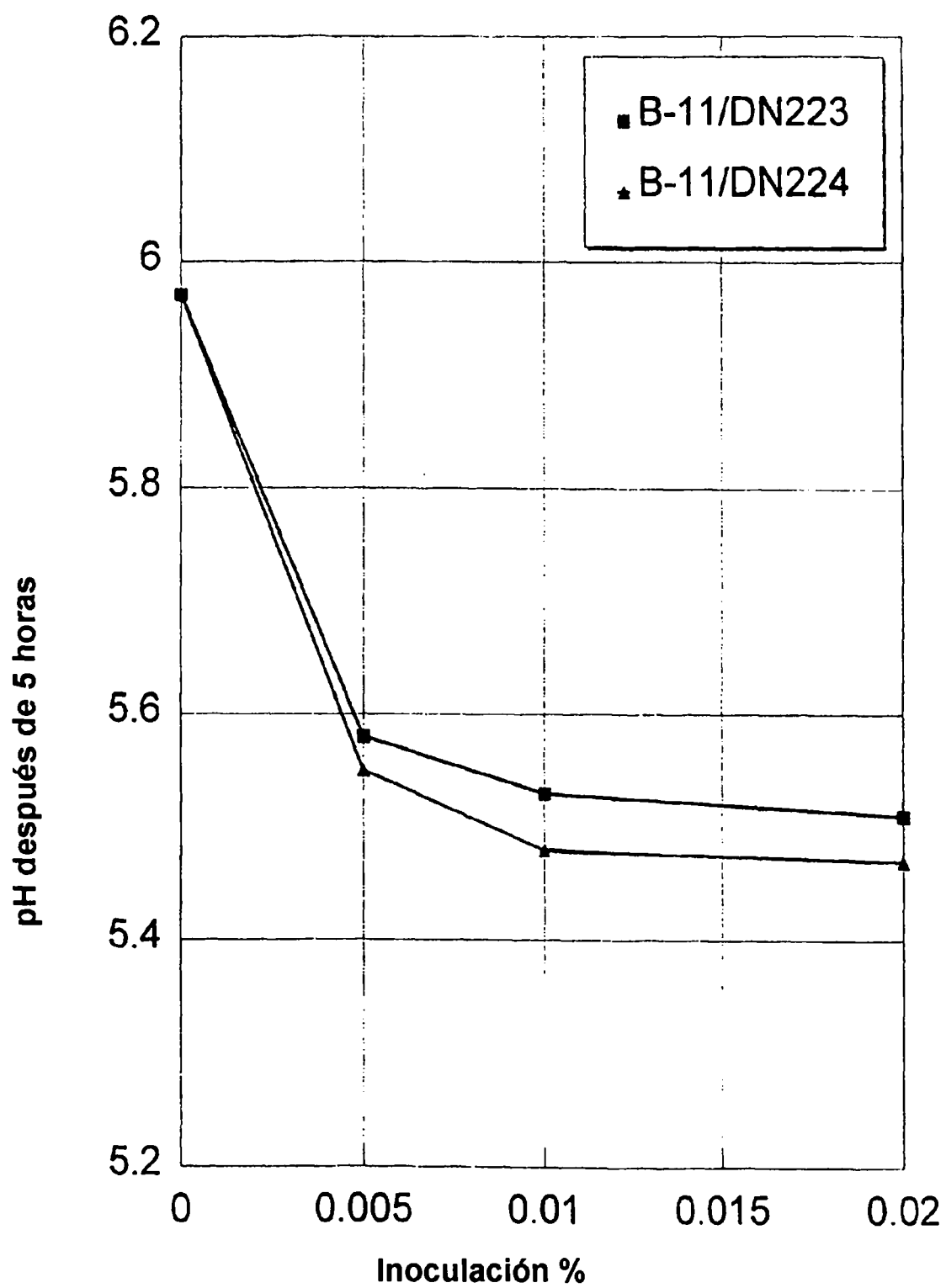
45

50

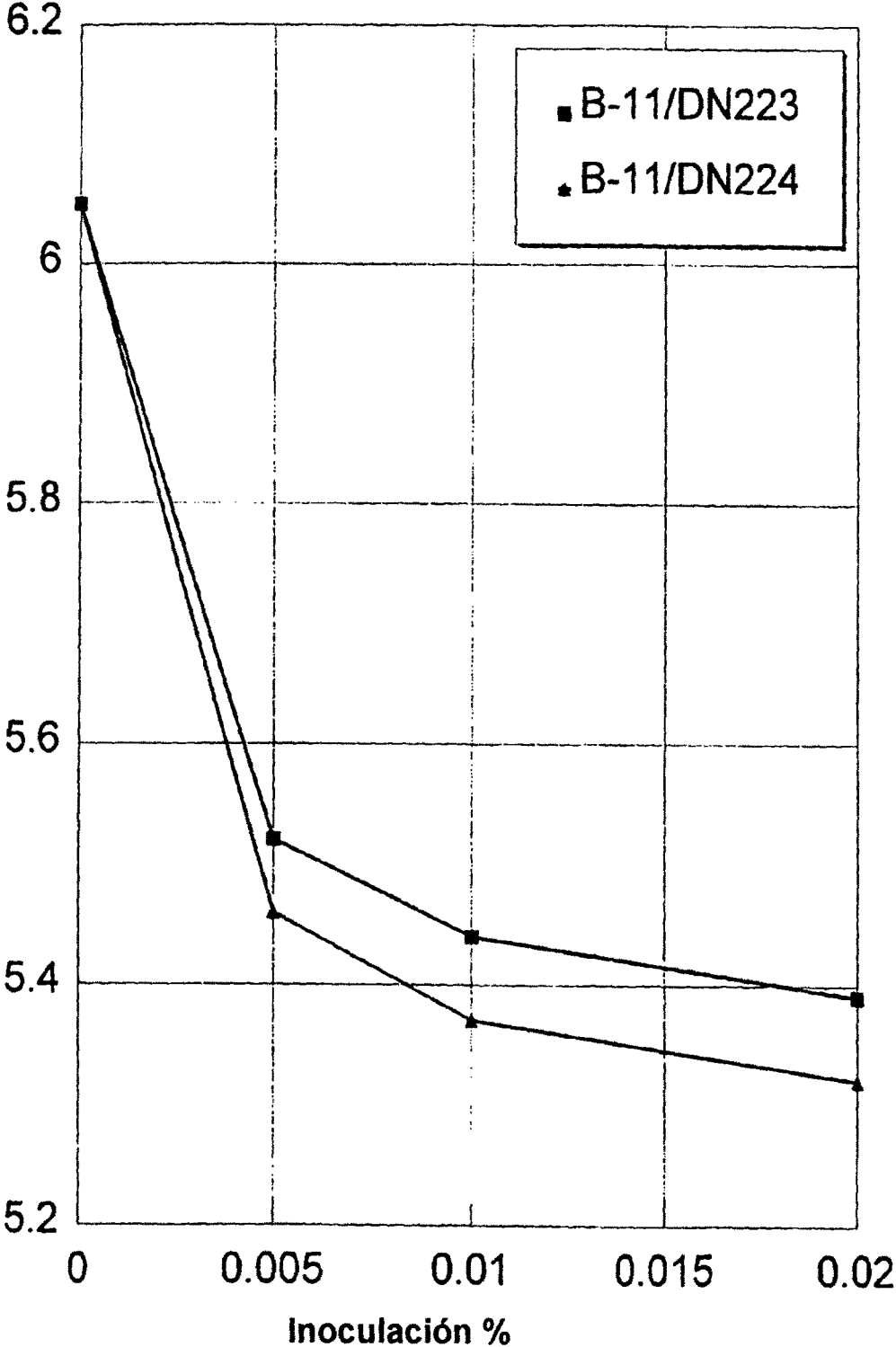
55

60

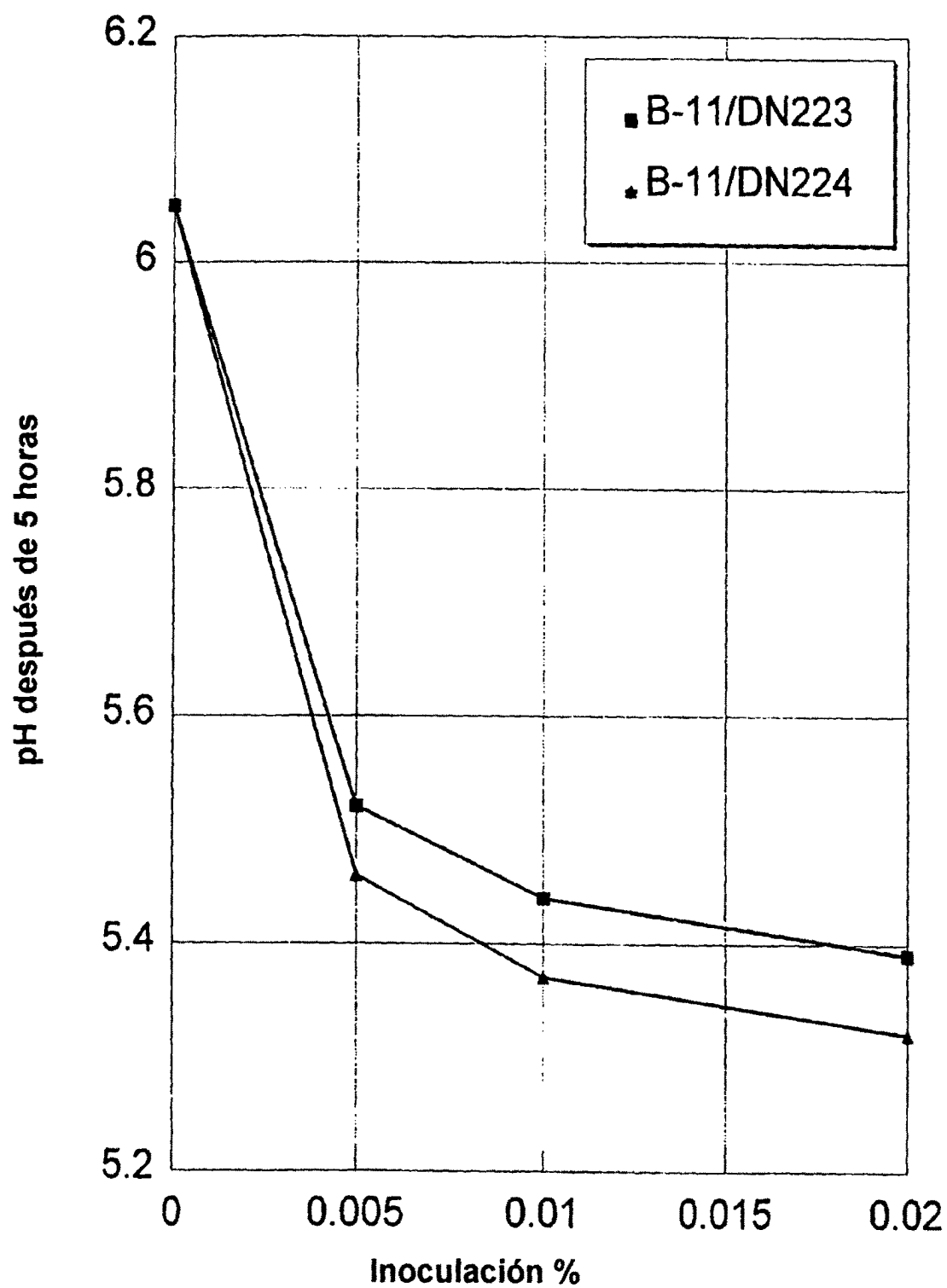
65



**Fig. 1**



**Fig. 3**



**Fig. 3**

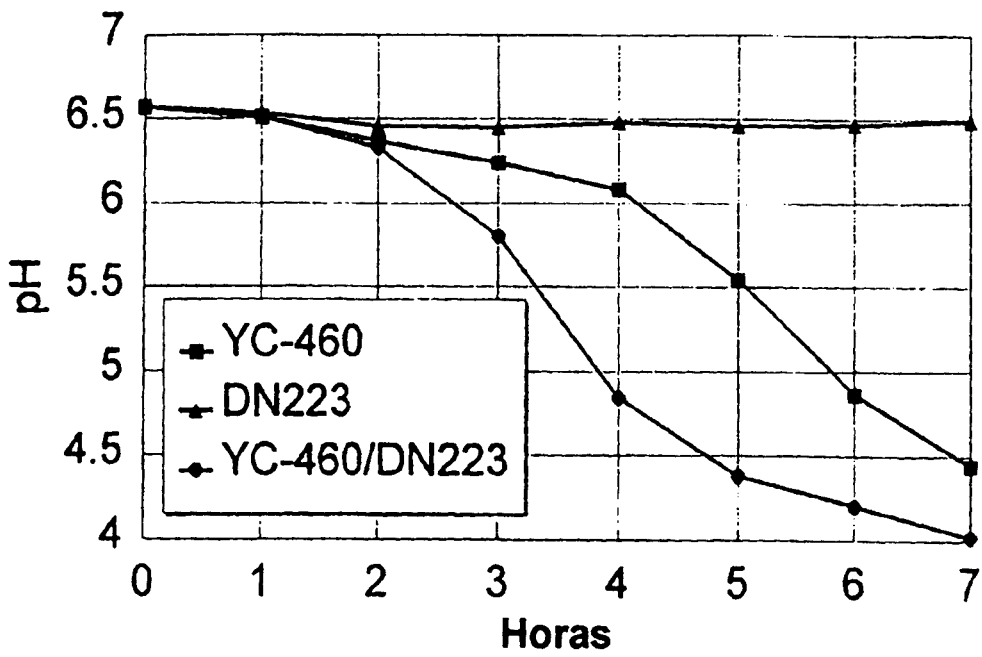


Fig. 4

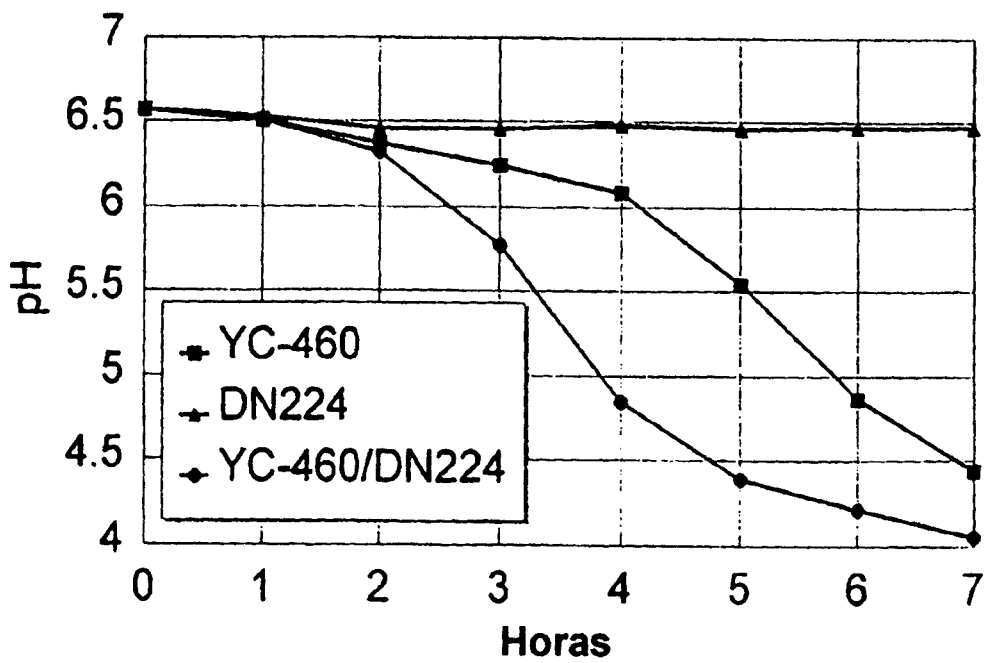
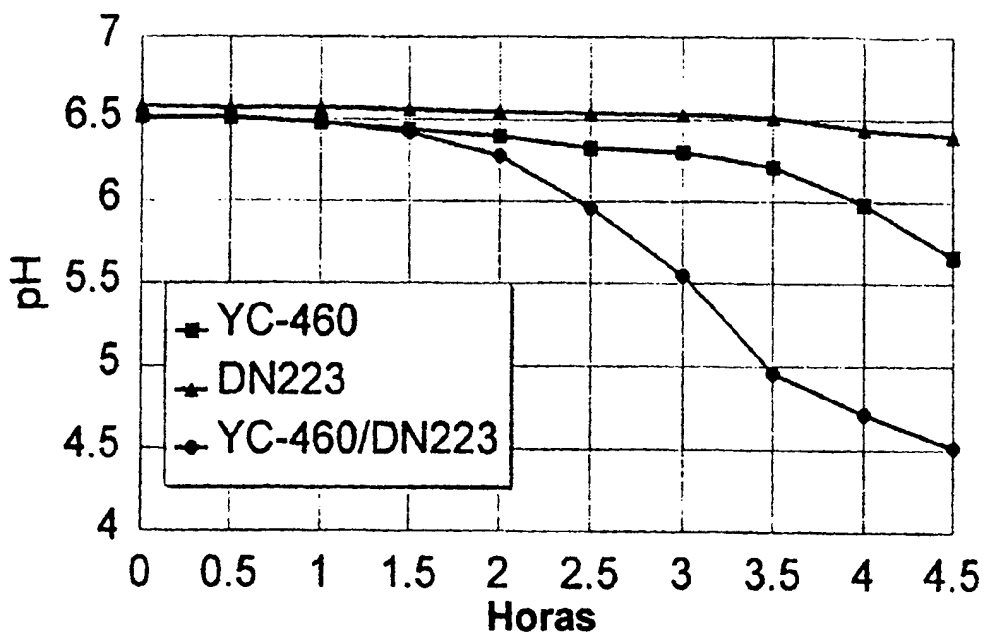
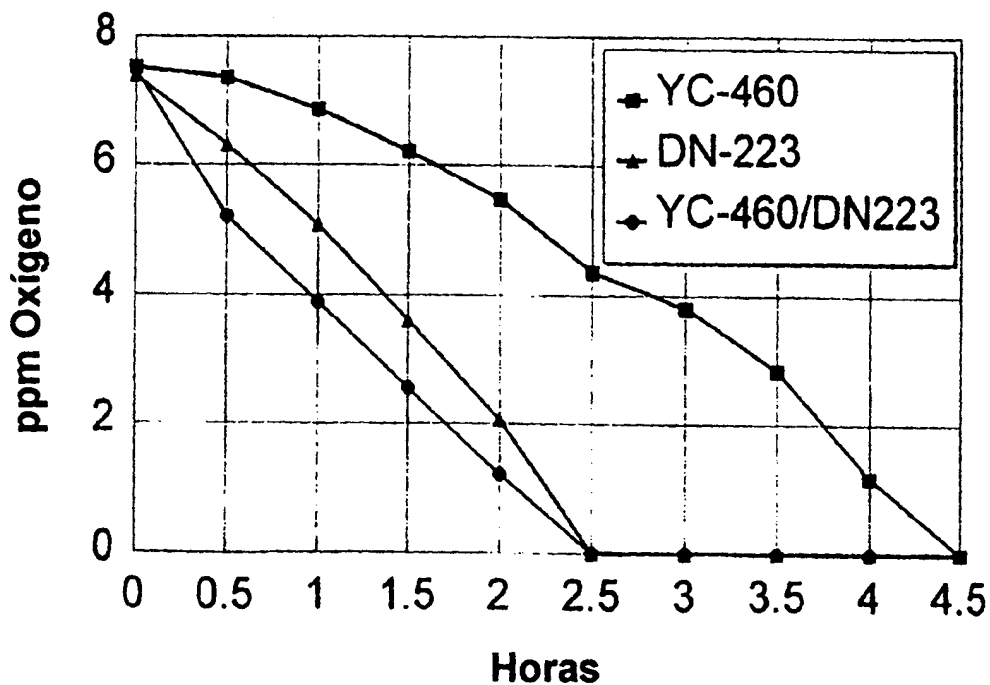


Fig. 5



**Fig. 6A**



**Fig. 6B**

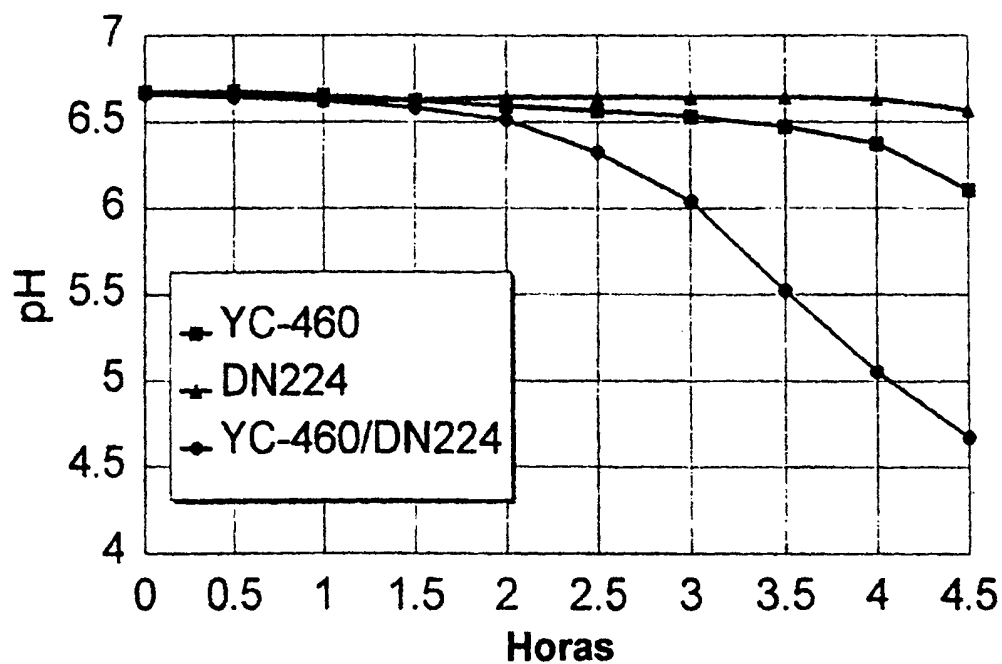


Fig. 7A

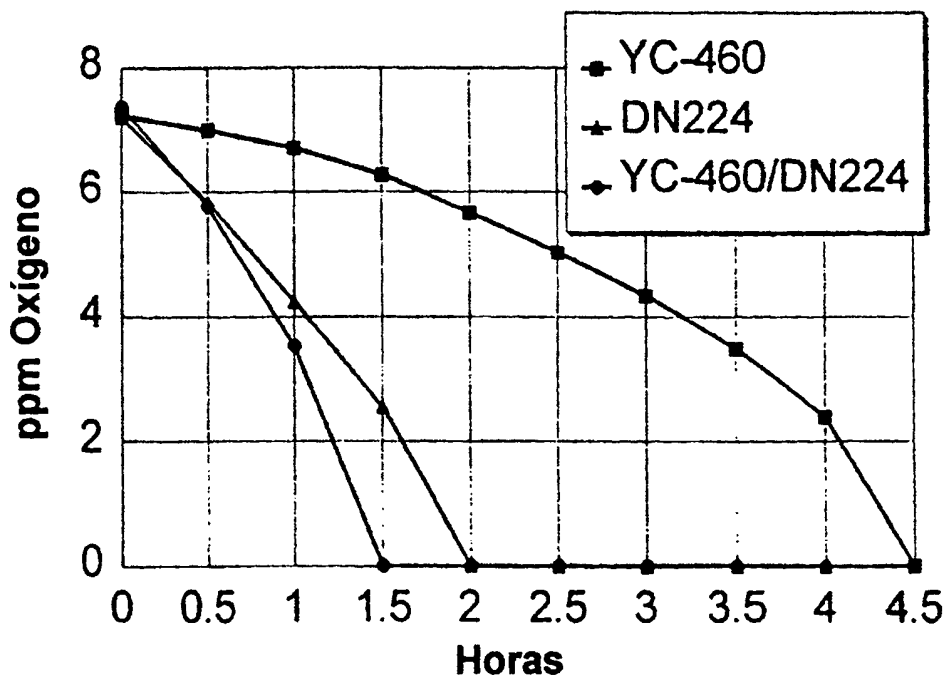
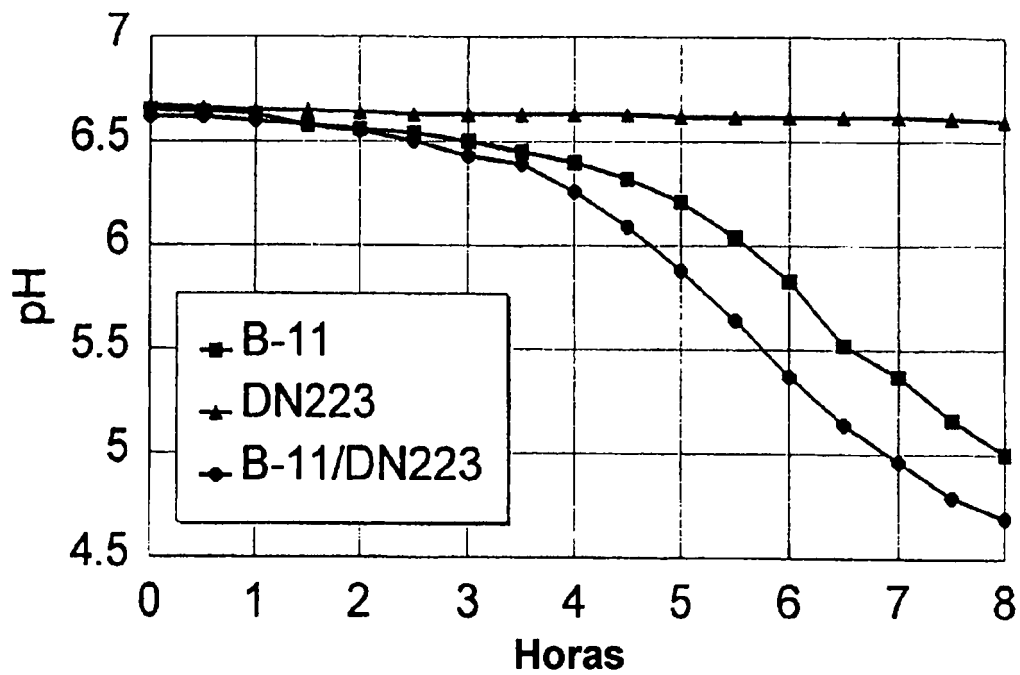
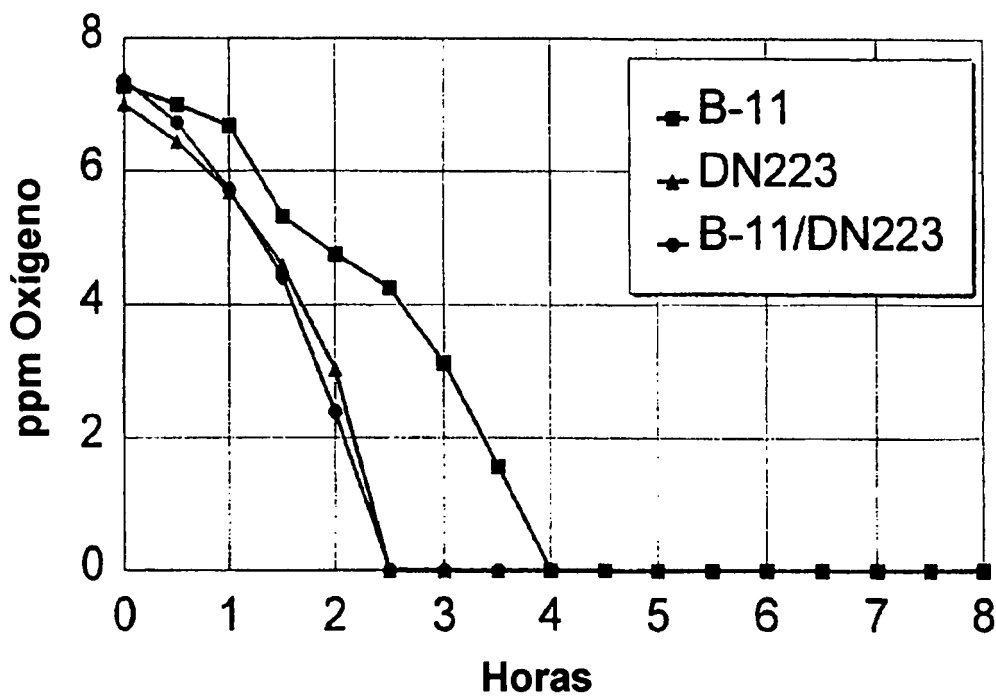


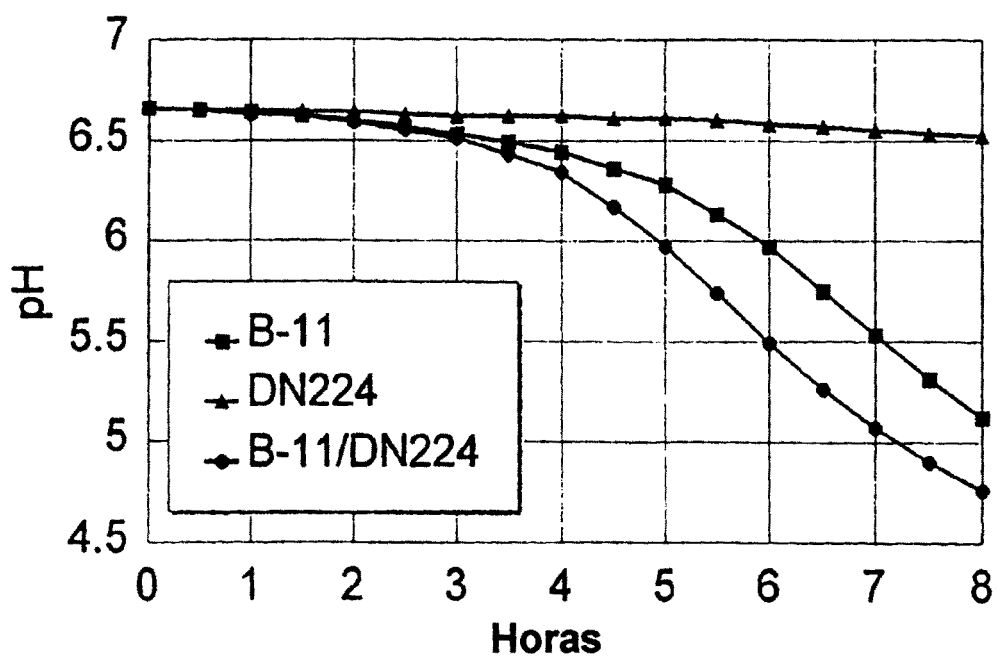
Fig. 7B



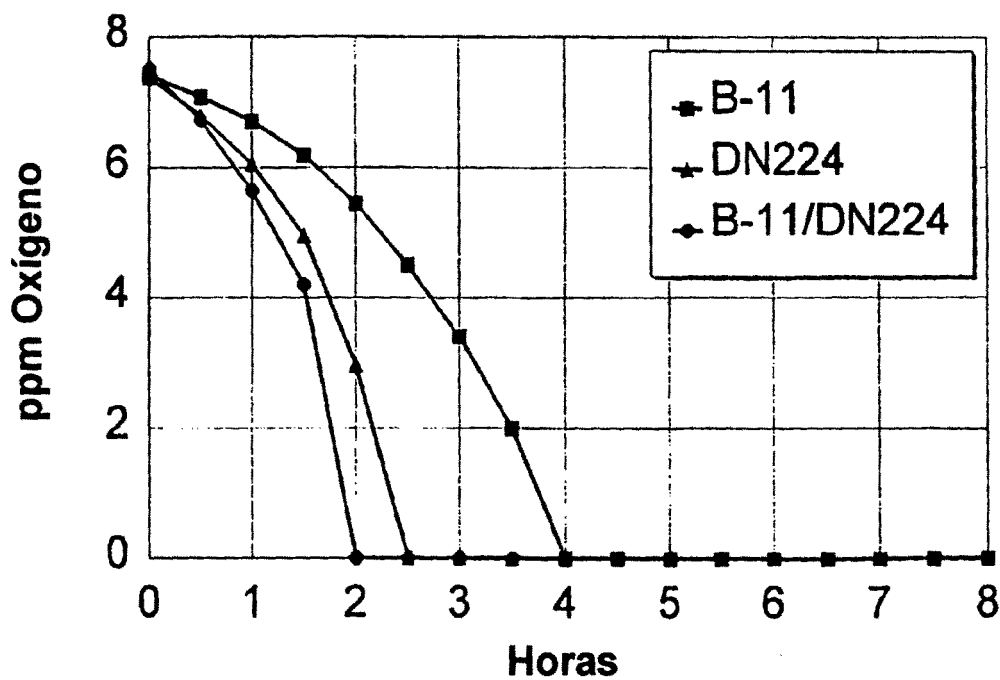
**Fig. 8A**



**Fig. 8B**



**Fig. 9A**



**Fig. 9B**

# ES 2 285 773 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

### (1) INFORMACIÓN GENERAL

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: Chr. Hansen A/S
  - (B) CALLE: Boege Allé 10-12
  - (C) CIUDAD: Hoersholm
  - 10 (D) PAÍS: Dinamarca
  - (E) CÓDIGO POSTAL : 2970
- 15 (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Método para mejorar la eficacia de cultivos iniciadores bacterianos de ácido láctico y composiciones del cultivo iniciador mejorado
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2
- (iv) SOPORTE INFORMÁTICO:
- 20 (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
  - (B) ORDENADOR: IBM compatible
  - (C) SISTEMA OPERATIVO: DOS
  - 25 (D) SOFTWARE: FastSEQ para Windows versión 2.0

### (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 1638 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: única
- 35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(iii) CARACTERÍSTICA:

- 40 (A) nombre/clave: secuencia de codificación
- (B) ubicación: 255 ...1582
- (D) otras Informaciones:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:1:

45	<p>CCCGATGCTC CCGATGTTCCG TGGAAATCATT GAACCTTTCAT CAGCTTTGGC TCGGGGTACA</p>	60
	<p>GCTTTTGATT CAGAACTAT GTGGCAAGCT TAATAATAAA TCTGTCAAAA TAATTTATTT</p>	120
	<p>TGACAGATTT TTTTATCTAA TAATTTAAAT AATTATTTCA CAATGTTTAC AAGCGCTTAC</p>	180
	<p>AAAAGAAAAT AGATTGACTT ATGCTAAACT GAATAATGTA AAAAGAATTT TACATTTAAA</p>	240
50	<p>GGAGACCTAT TAGT ATG AAA ATC GTA GTT ATC GGT ACA AAC CAC GCA GGC</p>	290
	<p>Met Lys Ile Val Val Ile Gly Thr Asn His Ala Gly</p>	
	<p>1 5 10</p>	
55	<p>ATT GCT ACA GCG AAT ACA TTA CTT GAA CAA TAT CCC GGG CAT GAA ATT</p>	338
	<p>Ile Ala Thr Ala Asn Thr Leu Leu Glu Gln Tyr Pro Gly His Glu Ile</p>	
	<p>15 20 25</p>	
60	<p>GTC ATG ATT GAC CGT AAT AGC AAC ATG AGT TAT CTA GGT TGT GGC ACA</p>	386
	<p>Val Met Ile Asp Arg Asn Ser Asn Met Ser Tyr Leu Gly Cys Gly Thr</p>	
	<p>30 35 40</p>	
65	<p>GCA ATT TGG GTT GGA AGA CAA ATT GAA AAA CCA GAT GAA TTA TTT TAT</p>	434
	<p>Ala Ile Trp Val Gly Arg Gln Ile Glu Lys Pro Asp Glu Leu Phe Tyr</p>	
	<p>45 50 55 60</p>	
65	<p>GCC AAA GCA GAG GAT TTT GAG GCA AAA GGG GTA AAA ATT TTG ACT GAA</p>	482
	<p>Ala Lys Ala Glu Asp Phe Glu Ala Lys Gly Val Lys Ile Leu Thr Glu</p>	
	<p>65 70 75</p>	

ES 2 285 773 T3

	ACA	GAA	GTT	TCA	GAA	ATT	GAT	TTT	GCT	AAT	AAG	AAA	GTT	TAT	GCA	AAA	530
	Thr	Glu	Val	Ser	Glu	Ile	Asp	Phe	Ala	Asn	Lys	Lys	Val	Tyr	Ala	Lys	
				80					85					90			
5	ACT	AAA	TCT	GAT	GAT	GAA	ATA	ATT	GAA	GCT	TAC	GAC	AAG	CTT	GTT	TTA	578
	Thr	Lys	Ser	Asp	Asp	Glu	Ile	Ile	Glu	Ala	Tyr	Asp	Lys	Leu	Val	Leu	
			95					100					105				
10	GCA	ACA	GGT	TCA	CGT	CCA	ATT	ATT	CCT	AAT	CTA	CCA	GGC	AAA	GAC	CTT	626
	Ala	Thr	Gly	Ser	Arg	Pro	Ile	Ile	Pro	Asn	Leu	Pro	Gly	Lys	Asp	Leu	
		110					115					120					
15	AAG	GGA	ATT	CAT	TTT	CTG	AAA	CTT	TTT	CAA	GAA	GGT	CAA	GCA	ATT	GAC	674
	Lys	Gly	Ile	His	Phe	Leu	Lys	Leu	Phe	Gln	Glu	Gly	Gln	Ala	Ile	Asp	
	125					130					135					140	
20	GCA	GAA	TTT	GCC	AAA	GAA	AAA	GTC	AAG	CGT	ATC	GCA	GTC	ATT	GGT	GCA	722
	Ala	Glu	Phe	Ala	Lys	Glu	Lys	Val	Lys	Arg	Ile	Ala	Val	Ile	Gly	Ala	
					145					150					155		
25	GGA	TAT	ATC	GGT	ACA	GAG	ATT	GCG	GAA	GCA	GCT	AAA	CGT	CGG	GGT	AAA	770
	Gly	Tyr	Ile	Gly	Thr	Glu	Ile	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	Arg	Arg	Gly	Lys	
				160				165						170			
30	GAA	GTT	CTT	CTC	TTT	GAC	GCT	GAA	AAT	ACT	TCA	CTT	GCA	TCA	TAT	TAT	818
	Glu	Val	Leu	Leu	Phe	Asp	Ala	Glu	Asn	Thr	Ser	Leu	Ala	Ser	Tyr	Tyr	
			175					180					185				
35	GAT	GAA	GAA	TTT	GCC	AAA	GGA	ATG	GAT	GAA	AAC	CTT	GCT	CAA	CAT	GGA	866
	Asp	Glu	Glu	Phe	Ala	Lys	Gly	Met	Asp	Glu	Asn	Leu	Ala	Gln	His	Gly	
		190					195					200					
40	ATT	GAA	CTT	CAT	TTT	GGA	CAA	CTG	GCC	AAA	GAA	TTT	AAA	GCG	AAT	GAG	914
	Ile	Glu	Leu	His	Phe	Gly	Gln	Leu	Ala	Lys	Glu	Phe	Lys	Ala	Asn	Glu	
	205					210					215					220	
45	GAA	GGT	TAT	GTA	TCA	CRA	ATC	GTA	ACC	AAC	AAG	GCG	ACT	TAT	GAT	GTT	962
	Glu	Gly	Tyr	Val	Ser	Gln	Ile	Val	Thr	Asn	Lys	Ala	Thr	Tyr	Asp	Val	
					225					230					235		
50	GAT	CTT	GTC	ATC	AAT	TGT	ATT	GGT	TTT	ACT	GCC	AAC	AGT	GCC	TTG	GCA	1010
	Asp	Leu	Val	Ile	Asn	Cys	Ile	Gly	Phe	Thr	Ala	Asn	Ser	Ala	Leu	Ala	
				240				245						250			
55	AGT	GAT	AAG	TTA	GCT	ACC	TTC	AAA	AAT	GGC	GCA	ATC	AAG	GTG	GAT	AAG	1058
	Ser	Asp	Lys	Leu	Ala	Thr	Phe	Lys	Asn	Gly	Ala	Ile	Lys	Val	Asp	Lys	
			255				260						265				
60	CAT	CAA	CAA	AGT	AGT	GAT	CCA	GAT	GTT	TAC	GCG	GTA	GGT	GAT	GTT	GCG	1106
	His	Gln	Gln	Ser	Ser	Asp	Pro	Asp	Val	Tyr	Ala	Val	Gly	Asp	Val	Ala	
		270				275						280					
65	ACA	ATT	TAT	TCT	AAT	GCC	TTG	CAA	GAT	TTT	ACT	TAT	ATC	GCT	CTT	GCC	1154
	Thr	Ile	Tyr	Ser	Asn	Ala	Leu	Gln	Asp	Phe	Thr	Tyr	Ile	Ala	Leu	Ala	
	285					290					295					300	
70	TCA	AAC	GCT	GTT	CGG	TCA	GGA	ATT	GTC	GCA	GGA	CAC	AAT	ATT	GGT	GGA	1202
	Ser	Asn	Ala	Val	Arg	Ser	Gly	Ile	Val	Ala	Gly	His	Asn	Ile	Gly	Gly	
					305					310					315		
75	AAA	GAA	TTA	GAA	TCT	GTT	GGT	GTT	CAA	GGT	TCT	AAT	GGT	ATT	TCG	ATT	1250
	Lys	Glu	Leu	Glu	Ser	Val	Gly	Val	Gln	Gly	Ser	Asn	Gly	Ile	Ser	Ile	
				320					325					330			
80	TTT	GGT	TAC	AAT	ATG	ACT	TCT	ACA	GGA	CTT	TCT	GTT	AAA	GCT	GCT	AAA	1298
	Phe	Gly	Tyr	Asn	Met	Thr	Ser	Thr	Gly	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Ala	Lys	
			335					340					345				



ES 2 285 773 T3

Met Lys Ile Val Val Ile Gly Thr Asn His Ala Gly Ile Ala Thr Ala  
 1 5 10 15  
 Asn Thr Leu Leu Glu Gln Tyr Pro Gly His Glu Ile Val Met Ile Asp  
 20 30  
 Arg Asn Ser Asn Met Ser Tyr Leu Gly Cys Gly Thr Ala Ile Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Arg Gln Ile Glu Lys Pro Asp Glu Leu Phe Tyr Ala Lys Ala Glu  
 50 55 60  
 Asp Phe Glu Ala Lys Gly Val Lys Ile Leu Thr Glu Thr Glu Val Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Ile Asp Phe Ala Asn Lys Lys Val Tyr Ala Lys Thr Lys Ser Asp  
 85 90 95  
 Asp Glu Ile Ile Glu Ala Tyr Asp Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Ser  
 100 105 110  
 Arg Pro Ile Ile Pro Asn Leu Pro Gly Lys Asp Leu Lys Gly Ile His  
 115 120 125  
 Phe Leu Lys Leu Phe Gln Glu Gly Gln Ala Ile Asp Ala Glu Phe Ala  
 130 135 140  
 Lys Glu Lys Val Lys Arg Ile Ala Val Ile Gly Ala Gly Tyr Ile Gly  
 145 150 155 160  
 Thr Glu Ile Ala Glu Ala Ala Lys Arg Arg Gly Lys Glu Val Leu Leu  
 165 170 175  
 Phe Asp Ala Glu Asn Thr Ser Leu Ala Ser Tyr Tyr Asp Glu Glu Phe  
 180 185 190  
 Ala Lys Gly Met Asp Glu Asn Leu Ala Gln His Gly Ile Glu Leu His  
 195 200 205  
 Phe Gly Gln Leu Ala Lys Glu Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Val  
 210 215 220  
 Ser Gln Ile Val Thr Asn Lys Ala Thr Tyr Asp Val Asp Leu Val Ile  
 225 230 235 240  
 Asn Cys Ile Gly Phe Thr Ala Asn Ser Ala Leu Ala Ser Asp Lys Leu  
 245 250 255  
 Ala Thr Phe Lys Asn Gly Ala Ile Lys Val Asp Lys His Gln Gln Ser  
 260 265 270  
 Ser Asp Pro Asp Val Tyr Ala Val Gly Asp Val Ala Thr Ile Tyr Ser  
 275 280 285  
 Asn Ala Leu Gln Asp Phe Thr Tyr Ile Ala Leu Ala Ser Asn Ala Val  
 290 295 300  
 Arg Ser Gly Ile Val Ala Gly His Asn Ile Gly Gly Lys Glu Leu Glu  
 305 310 315 320  
 Ser Val Gly Val Gln Gly Ser Asn Gly Ile Ser Ile Phe Gly Tyr Asn  
 325 330 335  
 Met Thr Ser Thr Gly Leu Ser Val Lys Ala Ala Lys Lys Leu Gly Leu  
 340 345 350  
 Glu Val Ser Phe Ser Asp Phe Glu Asp Lys Gln Lys Ala Trp Phe Leu  
 355 360 365  
 His Glu Asn Asn Asp Ser Val Lys Ile Arg Ile Val Tyr Glu Thr Lys  
 370 375 380  
 Ser Arg Arg Ile Ile Gly Ala Gln Leu Ala Ser Lys Ser Glu Ile Ile  
 385 390 395 400  
 Ala Gly Asn Ile Asn Met Phe Ser Leu Ala Ile Gln Glu Lys Lys Thr  
 405 410 415  
 Ile Asp Glu Leu Ala Leu Leu Asp Leu Phe Phe Leu Pro His Phe Asn  
 420 425 430  
 Ser Pro Tyr Asn Tyr Met Thr Val Ala Ala Leu  
 435 440