(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 542 514**

(51) Int. CI.:

A23C 9/123 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2008 E 08872207 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015 EP 2242373**

(54) Título: **Uso de L. casei subsp. paracasei como anti-fúngico**

(30) Prioridad:

04.12.2007 FR 0708451

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.08.2015

(73) Titular/es:

COMPAGNIE GERVAIS DANONE (100.0%)
17, Boulevard Haussmann
75009 Paris, FR

(72) Inventor/es:

PERRIER, LOUISE;
LOYSANCE-PAROUX, CATHERINE;
TIRILLY, YVES y
FUHRMANN, BENOIT

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Uso de *L. casei* subsp. *paracasei* como anti-fúngico

La presente invención se refiere al uso de la cepa CNCM I-1518 de *Lactobacillus casei* para proteger un producto lácteo contra el crecimiento de mohos.

El uso de microorganismos seleccionados con el fin de mejorar la conservación de los alimentos se conoce desde hace milenios. Entre estos microorganismos, se pueden mencionar bacterias del ácido láctico, que son ampliamente usadas para la conservación de productos lácteos, productos cárnicos o productos de origen vegetal destinados al consumo humano o animal. La mejora en la conservación de alimentos por las bacterias del ácido láctico se basa en gran medida en su capacidad para producir ácido láctico y otros ácidos orgánicos durante la fermentación que inhiben el crecimiento de microorganismos no deseables (bacterias y mohos) mediante la reducción del pH del medio, que es desfavorable para el crecimiento de estos microorganismos, y/o que tiene un efecto tóxico directo sobre ellos. Además de estos ácidos orgánicos, algunas bacterias del ácido láctico producen sustancias anti-fúngicas y/o anti-bacterianas, tales como peróxido de hidrógeno, diacetilo, o nisina.

La Solicitud EP 0221499 describe las propiedades anti-fúngicas de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* NRRL-B-15972. Cuando esta bacteria se cultiva en medio de agar suplementado con jugo de pepino, es capaz de inhibir completamente el crecimiento de Chaetomium olivacium, e inhibir parcialmente el de *Aspergillus terreus* y *Verticillium* sp. Sin embargo, en estas condiciones, no tiene ningún efecto sobre el crecimiento de *Penicillium oxalicum*; no obstante se observa un efecto inhibitorio sobre este microorganismo con cultivos de estas bacterias en jugo de pepino a un pH de 3,7 aproximadamente.

La Solicitud EP 0576780 describe los efectos anti-fúngicos de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* LC-705. Los cultivos de esta bacteria, obtenidos en un medio a base de suero de la leche, complementado con hidrolizado de caseína y extracto de levadura pueden inhibir el crecimiento de *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* y *Candida*.

La Solicitud PCT WO 97/36603 describe los efectos anti-fúngicos de *Lactobacillus casei* subsp. *casei* N94/49432. Cultivos de esta bacteria, que se obtienen en un medio sintético suplementado con extracto de levadura, tienen un efecto anti-fúngico sobre *Alternaria*, *Chaetomtum*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Cunninghamella*, *Dothiorella*, *Geotrichum*, *Phoma* y *Phomopsis*.

La Solicitud EP 1308506 describe los efectos anti-fúngicos y anti-bacterianos de una combinación de *Propionibacterium jensenii* con ciertas cepas de *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei*.

Los inventores ahora han constatado que las bacterias de la cepa CNCM I-1518 de la especie *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* poseían actividad anti-fúngica, en particular sobre mohos del género *Penicillium*, cuando se utilizan de forma aislada, es decir, sin estar asociadas a otras bacterias anti-fúngicas, y en particular con *Propionibacterium jensenii*.

Esta actividad anti-fúngica tiene las siguientes características:

No se desarrolla cuando la cepa CNCM I-1518 de *L. casei* se cultiva en medio sintético, pero aparece cuando se cultiva en leche o en un medio a base de leche, a partir de 5 horas de cultivo. Alcanza su máximo después de 24 a 48 horas de fermentación.

Es sensible al pH. Desaparece por debajo de pH 4, pero sin embargo vuelve a aparecer si el pH se eleva por encima de 4.

También es sensible al calor. Desaparece después de un tratamiento térmico de 1 minuto a 60 ºC.

Por otra parte no está relacionada con la producción de ácidos orgánicos tales como ácido sórbico, ácido propiónico o ácido benzoico (que son conocidos por su actividad anti-fúngica), o de peróxido de hidrógeno, sustancias que no son detectables en cultivos de la cepa CNCM I-1518 dotados de propiedades anti-fúngicas.

La presente invención se refiere al uso de bacterias de la cepa CNCM I-1518 de la especie *L. casei* subsp. *paracasei* para conferir propiedades anti-fúngicas a un producto lácteo fermentado.

En particular, la presente invención se refiere a un proceso para inhibir el desarrollo de un moho de la clase de los Ascomicetos, y especialmente del género *Penicillium* en un producto lácteo fermentado, caracterizado porque comprende la fermentación de un sustrato lácteo en presencia de una bacteria de la cepa CNCM I-1518 durante un tiempo suficiente para la aparición en el sustrato de una actividad anti-fúngica. Esta actividad anti-fúngica tiene el efecto de inhibir el desarrollo de dicho moho en caso de contaminación del producto por él después de la fermentación.

De manera ventajosa, la cantidad de dicha bacteria de la cepa CNCM I-1518 usada para inocular el sustrato lácteo para dicha fermentación es de al menos 10^6, preferentemente de al menos 10^7, y de manera ventajosa entre 10^7 y 10^8 ufc por gramo de sustrato lácteo.

Según una aplicación preferida del proceso de acuerdo con la invención, la fermentación de dicho sustrato lácteo se lleva a cabo durante al menos 5 horas, preferentemente durante al menos 15 horas, y lo más preferentemente durante 24 a 48 horas. Para obtener una actividad anti-fúngica usando tiempos de fermentación cortos, es preferible utilizar una cantidad relativamente grande de la cepa CNCM I-1518; por ejemplo, para observar actividad anti-fúngica después de 5 horas de fermentación del sustrato lácteo, la siembra se lleva a cabo a una velocidad de al menos 10^7 ufc por gramo de sustrato lácteo.

De acuerdo con otro modo de aplicación preferida del proceso de acuerdo con la invención, comprende, si es necesario, el ajuste del pH del sustrato fermentado a un valor superior a 4, preferentemente entre 4 y 6,5.

La cepa CNCM I-1518 se describe en particular en la Solicitud EP0794707; que fue presentada bajo las disposiciones del Tratado de Budapest el 30 de diciembre de 1994 en la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos), 25 rue du Docteur Roux, París.

La presente invención se entenderá mejor con la ayuda de la descripción adicional que sigue, que se refiere a ejemplos que ilustran la actividad anti-fúngica de la cepa CNCM I-1518.

EJEMPLO 1: PUESTA EN EVIDENCIA DE LA ACTIVIDAD ANTI-FÚNGICA DE PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS EN PRESENCIA DE *L. CASEI* SUBSP. *PARACASEI*.

Un producto lácteo fermentado que contiene *L. casei* subsp. *paracasei* (Actimel® que contiene la cepa CNCM I-1518 asociada a *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*), y un producto lácteo fermentado que contiene *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* (control) se inocularon con 6 especies de hongos en una cantidad de 10^2 esporas: *Mucor circinelloides* (2 cepas ensayadas); *Mucor plumbeus*; *Penicillium expansum*; *Penicillium roqueforti*; *Penicillium brevicompactum*.

Estas especies son representativas de las contaminaciones que se encuentran habitualmente en los productos lácteos frescos.

Los productos se incubaron a continuación a 10 ºC y se sometieron a ensayo cada 7 días para la aparición de tallos de crecimiento de hongos.

Se observa un desarrollo significativo de las especies de Mucor en ambos productos, a partir de 14 días en el caso de Actimel® y de 7 días para el producto de control. Sin embargo, se observa un crecimiento muy bajo (agregados) o una ausencia de crecimiento visible de *Penicillium* en Actimel® después de 40 días de incubación, mientras que se observa una invasión de la superficie del producto de control en sólo 14 días.

En una segunda serie de experimentos, se evaluó la actividad anti-fúngica de la cepa CNCM I-1518 mediante una técnica derivada de la de antibiogramas. Consiste en mezclar en agar el producto de ensayo (80% de producto + 20% de solución de agar a 15 g/l) y en verter la mezcla en una placa de Petri.

Sobre el medio solidificado se colocan 3 discos de papel estériles, sobre los que se depositan 100 esporas del moho a someter a ensayo (*P. expansum*. LMSA 00 083).

Las placas de Petri se incuban a 25 ºC y 10 ºC. El diámetro del tallo del hongo se mide periódicamente.

Los productos que fueron sometidos a ensayo son los siguientes: Actimel®; mezcla láctea de Actimel® con *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, sin la cepa CNCM 1-1518; mezcla láctea de Actimel® sin *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, fermentado durante 24 horas en presencia de la cepa CNCM 1-1518.

Los resultados de dos ensayos para cada una de las condiciones sometidas a ensayo se ilustran en la Tabla I siguiente.

TABLA I

	Diámetro del tallo después de la incubación (mm)		Diámetro del tallo mm) después de 17 días a 10 ºC		Diámetro del tallo después de 24 días a 10 ºC	
	Ensayo 1 8 días a 25 ºC	Ensayo 2 7 días a 25 ºC	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 1	Ensayo 2
Actimel® convencional (comercial)	17,6 ± 4,4	19,2 ± 4,8	9,6 ± 0,5	10 ± 0,9	10,9 ± 0,8	12,9 ± 1,8
Actimel® sin *L. casei*	> 65	> 65	> 65	> 65	> 65	> 65
Mezcla láctea de Actimel® fermentada 24 h con *L. casei* en ausencia de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*	9,4 ± 1	8,8 ± 1	11,4 ± 1	15,1 ± 1,2	14,1 ± 0,9	17,2 ± 1,2

Los dos productos que contienen la cepa CNCM I-1518 (Actimel®; y la mezcla láctea de Actimel® fermentado 24 h con *L. casei* en ausencia de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* presentan actividad anti-fúngica, al contrario que el producto que no la contiene (mezcla láctea de Actimel® sin *L. casei*).

EJEMPLO 2: CINÉTICA DE APARICIÓN DE ACTIVIDAD ANTI-FÚNGICA DURANTE LA FERMENTACIÓN POR *L. CASEI* SUBSP. *PARACASEI*

Se llevaron a cabo ensayo de actividad anti-fúngica sobre una mezcla (Mix) que consiste en leche desnatada suplementada con el 2% de glucosa y el 6% de proteínas de la leche (proteínas de leche desnatada convencionales), inoculada con 10^7 ufc/ml de la cepa CNCM I-1518 en forma liofilizada. Se tomaron muestras de mezcla antes y después de la inoculación con CNCM I-1518, y después de 15 h, 24 h, 48 h, y 72 h de fermentación. Antes de los ensayos de actividad anti-fúngica, las muestras tomadas y congeladas se irradiaron a 10 kG para bloquear el crecimiento de las bacterias con el fin de impedir su desarrollo y su metabolismo durante la prueba. Las muestras de ensayo se descongelan antes de su uso y el pH de la muestra se ajustó a 6,2 (pH de la mezcla de partida). Los ensayos se realizaron tal como se describe en el Ejemplo 1 anterior.

Los resultados de estos ensayos (medición del diámetro del tallo) se dan en la Tabla II a continuación. Los términos "Tallo sobre el disco" y "Agregados" se refieren a trazas de crecimiento de hongos observados solamente sobre el disco.

TABLA II

Ensayo de 7 días a 25 ºC					
Mezcla no inoculada	Mix + *L. casei*				
	T0	T15 h	T24 h	T48 h	T72 h
36,8 mm ± 10,2	22,5 mm ± 3,1	19,3 mm ± 2,7	Agregados	Agregados	Agregados
Ensayo de 19 días a 10 ºC					
Mezcla no inoculada	Mix + *L. casei*				
	T0	T15 h	T24 h	T48 h	T72 h
48,5 mm ± 1,9	13,8 mm ± 3,3	Tallo sobre el disco	Agregados	Agregados	Agregados

Estos ensayos muestran la aparición precoz de actividad anti-fúngica, que a veces aparece débilmente presente desde la inoculación, pero que sólo aparece claramente a partir de las 15 h de fermentación y alcanza un máximo entre las 24 y 48 horas. Esta actividad todavía está presente después de 48 horas y hasta 72 horas, siempre que el pH sea superior a 4.

EJEMPLO 3: SENSIBILIDAD DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA AL pH

Se realizaron ensayos de actividad anti-fúngica en las mismas condiciones que en el Ejemplo 2 anterior, pero sin el ajuste del pH antes de los ensayos.

Los resultados se muestran en la Tabla III a continuación.

TABLA III

	Mezcla no inoculada	Mix + *L. casei*				
		T0	T15 h	T24 h	T48 h	T72 h
pH	6,32	6,01	5,63	4,8	3,94	3,75
	33,2 ± 2,5	12,8 ± 1,3	Agregados	Agregados	34,3 ± 11,4	25,2 ± 2,1

Estos resultados muestran que la potencia anti-fúngica se altera cuando el pH es inferior a 4.

Esta alteración sin embargo parece reversible, restaurándose la potencia anti-fúngica cuando el pH se lleva a un valor superior a 4.

EJEMPLO 4: INFLUENCIA DEL MEDIO DE FERMENTACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD ANTI-FÚNGICA

Para determinar si la actividad anti-fúngica estaba vinculada al medio de cultivo, se llevaron a cabo ensayos usando por un lado como medio de cultivo la mezcla láctea descrita en el Ejemplo 2, y por otro un medio sintético de la siguiente composición: peptona 10 g/l; extracto de carne 10 g/l; extracto de levadura 5 g/l; fosfato dipotásico 2 g/l; citrato de amonio 2 g/l; sulfato de magnesio 0,1 g/l; sulfato de manganeso 0,05 g/l; glucosa 20 g/l; Tween 80:1 ml; cantidad suficiente para 1 l de agua desionizada. Estos medios se inocularon con 10^7 ufc/ml de la cepa CNCM I-1518 en forma liofilizada. Después de 24 y 48 horas de cultivo, la actividad anti-fúngica se sometió a ensayo como se describe en el Ejemplo 2, durante 7 días a 25 ºC y 20 días a 10 ºC.

Cuando el cultivo se realiza sobre la mezcla láctea, se observa una inhibición completa del crecimiento fúngico independientemente de la temperatura de ensayo. En contraste, no se observó inhibición alguna cuando el cultivo se

lleva a cabo en el medio sintético, para una población bacteriana equivalente.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una bacteria de la especie *L. casei* subsp. *paracasei* para conferir propiedades anti-fúngicas a un producto lácteo fermentado, dicha bacteria de la especie *L. casei* subsp. *paracasei* que es una bacteria de la cepa CNCM I-1518.

2. Proceso para inhibir el desarrollo de un moho de la clase de los Ascomicetos en un producto lácteo fermentado, **caracterizado porque** comprende la fermentación de un sustrato lácteo en presencia de una bacteria de la especie *L. casei* subsp. *paracasei* durante un tiempo suficiente para la aparición en el sustrato de una actividad anti-fúngica, dicha bacteria de la especie *L. casei* subsp. *paracasei* que es una bacteria de la cepa CNCM I-1518.

3. Proceso de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** la cantidad de dicha bacteria de la especie *L. casei* subsp. *paracasei* usada para inocular el sustrato lácteo para dicha fermentación es de al menos 10^6 UFC por gramo de sustrato lácteo.

4. Proceso de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado porque** la cantidad de dicha bacteria de la especie *L. casei* subsp. *paracasei* usada para inocular el sustrato lácteo para dicha fermentación es de al menos 10^7 UFC por gramo de sustrato lácteo.

5. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, **caracterizado porque** la fermentación de dicho sustrato lácteo se lleva a cabo durante al menos 5 horas.

6. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, **caracterizado porque** comprende, si es necesario, el ajuste del pH del sustrato fermentado a un valor superior a 4.

7. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, **caracterizado porque** dicho moho de la clase de los Ascomicetos pertenece al género *Penicillium*.