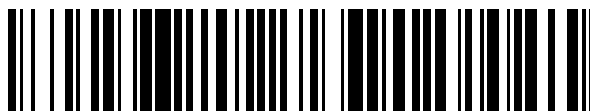


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 711**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20	(2006.01) A23C 19/076	(2006.01)
C12R 1/225	(2006.01) A23B 4/22	(2006.01)
A01N 63/00	(2006.01)	
A23L 3/3571	(2006.01)	
A23C 9/123	(2006.01)	
A23C 9/158	(2006.01)	
A61K 35/74	(2015.01)	
A23L 33/135	(2006.01)	
A61K 35/747	(2015.01)	
A23C 19/032	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.04.2013 PCT/EP2013/057410**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.10.2013 WO13153074**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2013 E 13714671 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2836587**

54 Título: **Bioprotección utilizando cepas de Lactobacillus rhamnosus**

30 Prioridad:

09.04.2012 EP 12163508
09.04.2012 WO PCT/EP2012/056384
22.05.2012 EP 12168977
08.02.2013 EP 13154591

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.08.2017

73 Titular/es:

CHR. HANSEN A/S (100.0%)
P.O. Box 407 Boge Alle 10-12
2970 Horsholm, DK

72 Inventor/es:

HORNBAEK, TINA;
LISBERG, MAIKE y
DIEMER, SILJA KEJ

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 630 711 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

Bioprotección utilizando cepas de *Lactobacillus rhamnosus*

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere al campo de la bioprotección, en particular a la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 con nº de depósito DSM23035. Además, la presente invención se refiere a una composición antifúngica que comprende la cepa, una composición antifúngica que comprende la cepa y al menos una cepa de *Lactobacillus paracasei*, alimento, pienso y productos farmacéuticos que comprenden dicha composición antifúngica, un método de fabricación de dicho alimento, pienso y productos farmacéuticos, un método para la reducción del contenido de levaduras y hongos de dicho alimento, pienso y productos farmacéuticos y uso de la composición antifúngica.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Durante muchos años, las bacterias de ácido láctico se han usado para aumentar el tiempo de conservación de productos alimenticios. Durante la fermentación, las bacterias de ácido láctico producen ácidos lácticos y otros ácidos orgánicos, lo que reduce el pH del producto alimenticio y lo vuelve desfavorable para el crecimiento de microorganismos no deseados, tales como bacterias patógenas, levaduras y mohos.

[0003] Adicionalmente, algunas bacterias de ácido láctico también producen metabolitos con actividad antimicrobiana.

[0004] La solicitud de patente europea nº EP0221499 describe las propiedades antifúngicas de *Lactobacillus rhamnosus* NRRL-B-15972, que es capaz de inhibir el crecimiento de diferentes mohos cuando se cultiva en medio de agar suplementado con zumo de pepino.

[0005] La solicitud de patente europea nº EP0576780 se refiere a *Lactobacillus rhamnosus* LC-705 que puede inhibir el crecimiento de *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* y *Candida* en un medio a base de suero de leche, suplementado con hidrolizado de caseína y con extracto de levadura.

[0006] La solicitud de patente europea nº EP1442113 se refiere a mezclas de *Propionibacterium jensenii* y *Lactobacillus* sp., tal como *Lactobacillus rhamnosus*, con actividades antimicrobianas para uso para bioprotección.

[0007] Sin embargo, sigue habiendo una necesidad de agentes bioprotectores con un efecto antifúngico mejorado como cepas únicas o en combinación con otras cepas bioprotectoras.

40 RESUMEN DE LA INVENCION

[0008] El objeto de la presente invención es proporcionar nuevas cepas de bacterias de ácido láctico con una eficacia alta como agentes bioprotectores.

[0009] Los presentes inventores han descubierto, mediante cribado e investigación exhaustivos, que determinadas cepas de *Lactobacillus rhamnosus* tienen un efecto significativamente más alto contra las levaduras y mohos en comparación con cultivos bioprotectores comerciales del mercado así como con el sorbato de potasio, un conservante químico usado habitualmente.

[0010] Los presentes inventores han descubierto además que un grupo determinado de bacterias de ácido láctico, cuando se combina con otro grupo de bacterias de ácido láctico, muestra un efecto antimicrobiano sinérgico significativo. El efecto antimicrobiano de los dos grupos de bacterias combinado, sorprendentemente, es mayor que la suma de los efectos individuales de los dos grupos de bacterias.

55 BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

[0011]

La FIGURA 1 representa el crecimiento de mohos en yogur con 1,5% de grasa fermentada con un cultivo iniciador YF-L901 solo (fila superior), junto con HOLDBAC™ YM-B (fila intermedia) y junto con *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366. Los contaminantes objetivo se añadieron a las concentraciones mencionadas en el texto de izquierda a derecha: *Penicillium brevicompactum* (M1), *Penicillium commune* (M6), *Aspergillus versicolor* (M7) y *Penicillium crustosum* (M10), respectivamente. Los yogures se habían incubado a 7±17°C durante 45 días.

La FIGURA 2 representa el recuento de células de un aislado de *Debaryomyces hansenii* añadido a yogur con 1,5% de grasa fermentado con un cultivo iniciador YF-L901 solo (Referencia) o junto con las cepas

siguientes: HOLDBAC™ YM-B (HoldBac YM-B), HOLDBAC™ YM-C (HoldBac YM-C) o *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (CHCC 5366). Los yogures se almacenaron a $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ y se analizaron a intervalos adecuados.

La FIGURA 3 muestra el crecimiento de mohos en placas obtenidos a partir de leche fermentada con un cultivo iniciador solo (referencia, primera imagen), junto con *Lb. Paracasei* CHCC14676 (segunda imagen), junto con *Lb. Rhamnosus* CHCC5366 (tercera imagen) o junto con una combinación de *Lb. Paracasei* CHCC14676 y *Lb. Rhamnosus* CHCC5366 (cuarta imagen). Los contaminantes objetivo se añadieron a las concentraciones mencionadas en el texto desde arriba a la izquierda y desplazándose en el sentido de las agujas del reloj hasta abajo a la izquierda de la placa: *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium commune*, *Aspergillus versicolor* y *Penicillium crustosum*, respectivamente. Las placas se habían incubado a $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 12 días.

La FIGURA 4 muestra el crecimiento de: (1) *Penicillium solitum*, (2) *P. palitans*, (3) *P. discolor*, (4) *P. spathulatum*, (5) *P. commune*, (6). *P. crustosum*, (7) *P. paneum*, (8) *P. roqueforti* en un yogur de referencia (columna izquierda), un yogur hecho con 0,023% de sorbato de potasio (columna intermedia) y un yogur hecho con $1\text{E}+07$ ufc/g de CHCC5366 (columna derecha) después de 60 días de incubación a 7°C inoculados en concentraciones de aprox. 1000 esporas/vaso.

La FIGURA 5 muestra el crecimiento de *Mucor* ssp. en yogur griego obtenido a partir de leche fermentada con un cultivo iniciador solo (vaso de la izquierda) o de leche fermentada en presencia de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (vaso de la derecha).

La FIGURA 6 muestra el crecimiento del moho *Rhizopus stolonifer* en yogur griego preparado a partir de leche fermentada con un cultivo iniciador solo (R. es decir, Referencia), con el cultivo iniciador y HOLDBAC™ YM-B (iM-B), con el cultivo iniciador y *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366), o con el cultivo iniciador y una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5366+14676).

La FIGURA 7 muestra el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en queso blanco en salmuera hecho a partir de leche fermentada sólo con cultivo iniciador (referencia); con cultivo iniciador y HOLDBAC™ YM-B (iM-B); o con cultivo iniciador, *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 y *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366+14676).

La FIGURA 8 muestra el crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* en queso blanco en salmuera hecho a partir de leche fermentada sólo con cultivo iniciador (referencia); con cultivo iniciador y HOLDBAC™ YM-B (iM-B); o con cultivo iniciador, *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 y *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366+14676).

La FIGURA 9 muestra el crecimiento de *Penicillium commune* en queso blanco en salmuera hecho a partir de leche fermentada sólo con cultivo iniciador (R, es decir, referencia); con cultivo iniciador y HOLDBAC™ YM-B (iM-B); o con cultivo iniciador, *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 y *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366+14676).

La FIGURA 10 muestra el crecimiento de *P. Crustosum* en queso blanco en salmuera hecho a partir de leche fermentada sólo con cultivo iniciador (R, es decir, referencia); con cultivo iniciador y HOLDBAC™ YM-B (iM-B); o con cultivo iniciador y *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366).

La FIGURA 11 representa el crecimiento del moho *Penicillium paneum* en yogur con 1,5% de grasa obtenido a partir de leche fermentada sólo con un cultivo iniciador (R, es decir referencia), con el cultivo iniciador y HOLDBAC™ YM-B (iM-B), con el cultivo iniciador y *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366), o con el cultivo iniciador y una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5366+14676).

La FIGURA 12 muestra el crecimiento del moho *Penicillium crustosum* en yogur con 1,5% de grasa obtenido a partir de leche fermentada sólo con un cultivo iniciador (fila superior), con cultivo iniciador y HOLDBAC™ YM-B (segunda fila), con cultivo iniciador y *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (tercera fila) o con cultivo iniciador y una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (fila inferior).

El contaminante objetivo se añadió en concentraciones de 100 esporas/vaso y los yogures se habían incubado a $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ (columna izquierda), $12\pm 1^{\circ}\text{C}$ (columna central) o $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ (columna derecha) durante 36 días.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

[0012] Como se utiliza en este caso, el término "bacteria de ácido láctico" designa una bacteria grampositiva microaerofílica o anaeróbica, que fermenta azúcares con la producción de ácidos incluyendo ácido láctico como el ácido producido predominantemente. Las bacterias de ácido láctico más útiles industrialmente se encuentran en el orden "Lactobacillales", que incluye *Lactococcus*, spp. *Streptococcus*, spp. *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudoleuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp. y *Enterococcus* spp. Éstas se usan frecuentemente como cultivos de alimentos solas o en combinación con otras bacterias de ácido láctico.

[0013] Se entiende que el término "alimento" también incluye el queso. Se entiende que el término "queso" abarca cualquier queso, incluyendo quesos duros semiduros y blandos, tales como quesos de los siguientes tipos: cottage, feta, cheddar, parmesano, mozzarella, emmental, danbo, gouda, edam, de tipo feta, quesos azules, quesos salados, camembert y brie. El experto en la técnica sabe cómo convertir la cuajada en queso, y se pueden encontrar métodos en la bibliografía, véase por ejemplo Kosikowski, F. V., y V. V. Mistry, "Cheese and Fermented Milk Foods", 1997, 3rd Ed. F. V. Kosikowski, L. L. C. Westport, CT. Como se utiliza en este caso, un queso que tiene una concentración de NaCl por debajo de 1,7% (p/p) se denomina un "queso bajo en sal".

[0014] Las bacterias de ácido láctico, incluyendo bacterias de las especies *Lactobacillus* sp. y *Lactococcus* sp., normalmente se suministran a la industria láctea o bien como cultivos congelados o liofilizados para la propagación de iniciadores en masa o como los denominados cultivos "Direct Vat Set" o de "inoculación directa a cuba" (SVD), destinados a la inoculación directa en una cuba o tina de fermentación para la producción de un producto lácteo, tal como un producto lácteo fermentado o un queso. Tales cultivos bacterianos de ácido láctico se denominan en general "cultivos iniciadores" o "iniciadores".

[0015] El término "mesófilo" en este contexto se refiere a microorganismos que crecen mejor a temperaturas moderadas (15°C-40°C). Las bacterias mesofílicas más útiles industrialmente incluyen *Lactococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. El término "fermentación mesofílica" en este contexto se refiere a la fermentación a una temperatura entre aproximadamente 22°C y aproximadamente 35°C. El término "producto lácteo fermentado mesofílico" se refiere a productos lácteos fermentados preparados mediante fermentación mesofílica de un cultivo iniciador mesofílico e incluyen productos lácteos fermentados como suero de leche, leche agria, leche cultivada, smetana, crema agria y queso fresco, tal como quark, tvarog y queso crema.

[0016] El término "termófilo" en este contexto se refiere a microorganismos que crecen mejor a temperaturas por encima de 43°C. Las bacterias termofílicas más útiles industrialmente incluyen *Streptococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. El término "fermentación termofílica" en este contexto se refiere a la fermentación a una temperatura aproximadamente por encima de 35°C, tal como entre aproximadamente 35°C y aproximadamente 45°C. El término "producto lácteo fermentado termofílico" se refiere a productos lácteos fermentados preparados mediante fermentación termofílica de un cultivo iniciador termofílico e incluyen productos lácteos fermentados como el yogur firme, el yogur batido y el yogur líquido.

[0017] El término "leche" debe entenderse como la secreción láctea obtenida mediante el ordeño de cualquier mamífero, por ejemplo vacas, ovejas, cabras, búfalos o camellos. En una forma de realización preferida, la leche es leche de vaca. El término leche también incluye soluciones de proteína/grasa hechas de materiales vegetales, por ejemplo leche de soja.

[0018] El término "sustrato de leche" puede ser cualquier material de leche crudo y/o procesado que se pueda someter a fermentación según el método de la invención. De este modo, los sustratos de leche útiles incluyen, pero de forma no limitativa, soluciones/suspensiones de cualquier producto lácteo o derivado lácteo que comprenden proteína, tal como leche de grasa entera o baja en grasa, leche desnatada, suero de leche, leche en polvo reconstituida, leche condensada, leche deshidratada, suero de leche, permeato de suero de leche, lactosa, líquido madre de cristalización de lactosa, concentrado de proteína de suero de leche, o nata. Obviamente, el sustrato de leche puede proceder de cualquier mamífero, por ejemplo leche de mamífero sustancialmente pura, o leche en polvo reconstituida.

[0019] Antes de la fermentación, el sustrato de leche se puede homogeneizar y pasteurizar según métodos conocidos en la técnica.

[0020] "Homogenización" como se utiliza en este caso significa una mezcla intensiva para obtener una emulsión o suspensión soluble. Si la homogeneización se realiza antes de la fermentación, se puede realizar para dividir la grasa láctea en tamaños menores de modo que ésta ya no se separe de la leche. Esto se puede realizar haciendo pasar la leche a través de pequeños orificios a alta presión.

[0021] "Pasteurización" según se utiliza en este contexto significa el tratamiento del sustrato de leche para reducir o eliminar la presencia de organismos vivos, tales como microorganismos. Preferiblemente, la pasteurización se logra manteniendo una temperatura específica durante un periodo de tiempo específico. La temperatura específica se logra normalmente por calentamiento. La temperatura y la duración se pueden seleccionar de modo que se maten o inactiven ciertas bacterias, tales como bacterias nocivas. Un paso de

enfriamiento rápido puede ir a continuación.

[0022] "Fermentación", en los métodos de la presente invención, significa la conversión de carbohidratos en alcoholes o ácidos a través de la acción de un microorganismo. Preferiblemente, la fermentación en los métodos de la invención comprende la conversión de lactosa en ácido láctico.

[0023] Los procesos de fermentación para ser usados en la producción de productos lácteos son ampliamente conocidos y el experto en la técnica sabrá cómo seleccionar condiciones del proceso adecuadas, tales como temperatura, oxígeno, cantidad y características del/de los microorganismo(s) y tiempo de proceso.

Obviamente, las condiciones de fermentación se seleccionan para favorecer el logro de la presente invención, es decir, para obtener un producto lácteo en forma sólida (tal como un queso) o forma líquida (tal como un producto lácteo fermentado).

[0024] Las composiciones de la invención proporcionan la ventaja de que se pueden inhibir los microorganismos no deseados seleccionados de entre hongos, bacterias y mezclas de los mismos, por ejemplo en alimentos, piensos y productos farmacéuticos y en seres humanos y animales. La prevención y/o inhibición del crecimiento de hongos, tales como levaduras y mohos, está particularmente prevista. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, el término "antimicrobiano" debe entenderse como "antifúngico".

[0025] El término "microorganismos no deseados" en este contexto se refiere a microorganismos tales como bacterias y hongos, tales como levaduras, que son patógenos y/o capaces de deteriorar alimentos, piensos o productos farmacéuticos. Las composiciones de la invención proporcionan la ventaja de que se pueden inhibir los microorganismos no deseados seleccionados de hongos, bacterias y mezclas de los mismos, por ejemplo en alimentos, piensos y productos farmacéuticos y en seres humanos y animales. La prevención y/o inhibición del crecimiento de hongos, tales como levaduras y mohos, está particularmente prevista.

[0026] Los términos "inhibir" y "ser inhibidor" en relación con levaduras y mohos significa, por ejemplo, que el crecimiento o el número o la concentración de levaduras y mohos, por ejemplo en productos alimenticios y/o en la superficie de productos alimenticios que comprenden las cepas según la presente invención, es menor que en productos alimenticios y/o en la superficie de productos alimenticios que no comprenden tales cepas.

[0027] En el presente contexto, el término "mutante" debería entenderse como una cepa derivada a partir de una cepa de la invención mediante, por ejemplo, ingeniería genética, radiación y/o tratamiento químico.

Se prefiere que la mutante sea una mutante equivalente funcionalmente, por ejemplo una mutante que tiene sustancialmente las mismas propiedades, o mejoradas (por ejemplo en cuanto a las propiedades antifúngicas), que la cepa progenitora. Tal mutante forma parte de la presente invención. Especialmente, el término "mutante" se refiere a una cepa obtenida sometiendo a una cepa de la invención a cualquier tratamiento de mutagenización usado de forma convencional que incluye un tratamiento con un mutágeno químico tal como etano-metano-sulfonato (EMS) o N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG), luz UV o a una mutante presente de forma espontánea. Una mutante se puede haber sometido a más tratamientos de mutagenización (un tratamiento único debería entenderse como un paso de mutagenización seguido de una etapa de cribado/selección), pero actualmente se prefiere que no se lleven a cabo más de 20, o no más de 10, o no más de 5 tratamientos (o pasos de cribado/selección). En una mutante preferida actualmente, menos del 5%, o menos del 1% o incluso menos del 0,1% de los nucleótidos en el genoma bacteriano han sido desplazados con otro nucleótido, o eliminados, en comparación con la cepa progenitora.

[0028] El uso de los términos "un" y "el" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se deben interpretar cubriendo el singular y el plural, a menos que se indique lo contrario en este texto o el contexto lo contradiga claramente.

Los términos "que comprende(n)", "que tiene(n)", "que incluye(n)" y "que contiene(n)" se deben interpretar como términos abiertos (es decir, con el significado de "que incluye(n)", pero no se limita(n) a,) a menos que se indique lo contrario. Las enumeraciones de rangos de valores en este texto están destinadas meramente a servir como un método abreviado de hacer referencia individualmente a cada valor separado que esté dentro del rango, a menos que se indique lo contrario en el texto, y cada valor separado se incorpora a la especificación como si estuviera enumerado individualmente en ella. Todos los métodos aquí descritos se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario aquí o a menos que lo contradiga claramente el contexto del presente documento. El uso de cualquier ejemplo y de todos los ejemplos o de expresiones ejemplificadoras (como "tal como") proporcionadas aquí tiene la mera intención de aclarar mejor la invención y no plantea una limitación en el ámbito de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ninguna expresión de la especificación debería interpretarse como indicativa de que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.

Implementación y aspectos de la invención

[0029] Los presentes inventores han realizado un cribado entre 200 candidatos de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus* para encontrar las cepas más eficaces contra una gama

amplia de microorganismos, tales como levaduras y mohos.

[0030] Las pruebas de cribado se realizaron en un ensayo modelo que imitaba productos lácteos fermentados mesofílicos en la medida de lo posible en medios a base de leche a los que se añadió un cultivo iniciador pertinente con o sin candidatos bioprotectores y que se fermentó bajo condiciones pertinentes para productos lácteos fermentados mesofílicos. Los organismos objetivo se aislaron de los productos lácteos fermentados mesofílicos. Las bacterias de ácido láctico purificadas procedentes de los cultivos HOLDBAC™ de Danisco A/S, Dinamarca, al igual que los cultivos completos HOLDBAC™ YM-B y HOLDBAC™ YM-C cultivos, que contienen tanto bacterias de ácido láctico como bacterias de ácido propiónico, se usaron como punto de referencia. El ensayo modelo se describe en la solicitud de patente europea nº EP11161609.0. Se descubrió que diecisiete candidatos entre *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus* inhibían generalmente los 12 hongos indicadores tan bien o mejor que las bacterias de ácido láctico de referencia cuando se evaluaron a 25°C.

Cuando se evaluó en yogur, una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 depositada en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (DSMZ) con el número de depósito DSM23035, demostró ser significativamente mejor en la inhibición de levaduras y mohos que un cultivo bioprotector disponible comercialmente.

El efecto inhibitorio de la cepa contra las levaduras y mohos podrían determinarse mediante el almacenamiento de los productos lácteos fermentados a una temperatura adecuada durante un tiempo de almacenamiento adecuado como se describe en los ejemplos que aparecen a continuación.

En general, la temperatura adecuada a la que este método debería realizarse depende de la temperatura en la que el alimento, pienso o producto farmacéutico específico, se almacena y/o se fabrica normalmente.

La temperatura a la que los productos se almacenan normalmente está entre 5°C y 26°C, preferiblemente la temperatura es aproximadamente 8°C. El tiempo de almacenamiento a dicha temperatura depende del tiempo durante el que el alimento, pienso, o producto farmacéutico se almacena normalmente (vida útil de almacenamiento). El tiempo de almacenamiento es normalmente 5-65, preferiblemente 7-60 días, más preferiblemente 7-28 días, e incluso más preferiblemente el tiempo de almacenamiento es aproximadamente 21 días.

Por consiguiente, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* seleccionada del grupo consistente en la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 que fue depositada en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (DSMZ) con el número de depósito DSM23035 Y cepas mutantes derivadas de la misma, donde las cepas mutantes tienen sustancialmente las mismas propiedades antifúngicas o mejoradas que la cepa con el número de depósito nº DSM23035.

Así, además de la cepa depositada mencionada anteriormente, la invención también se refiere a mutantes que se han derivado de esta cepa, es decir, que se han obtenido usando la cepa depositada CHCC5366 como material de partida. La cepa mutante se puede derivar de la cepa depositada, por ejemplo, mediante ingeniería genética, radiación, luz UV, tratamiento químico y/o métodos que inducen cambios en el genoma.

Una mutante según la invención inhibirá y/o prevendrá el crecimiento de ciertas bacterias u hongos, preferiblemente mohos. Se prefiere que la mutante tenga esencialmente al menos el 80% o más, al menos el 90% o más, al menos el 95% o más, o incluso hasta el 100% o más del efecto antifúngico en comparación con su cepa progenitora cuando se determina, por ejemplo, en un ensayo como se describe en el ejemplo 1 que usa uno de los mohos *P. brevicompactum*, *P. commune*, *A. versicolor*, *D. hansenii* o *P. crustosum* como organismo de referencia cuyo crecimiento debe ser inhibido. Dichas mutantes tienen sustancialmente las mismas propiedades antifúngicas o mejoradas que la cepa con el número de depósito DSM23035.

[0031] Es evidente para la persona experta que, al usar la cepa depositada como material de partida, el lector experto puede obtener de forma rutinaria por mutagénesis convencional o técnicas de reaislamiento otras mutantes o derivadas de la misma que conservan las características y ventajas pertinentes descritas aquí.

Por consiguiente, el término "cepas mutantes derivadas de la misma" del primer aspecto se refiere a cepas mutantes obtenidas usando la cepa depositada como material de partida.

[0032] Un segundo aspecto se refiere a una composición antifúngica que comprende al menos una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* según el primer aspecto de la invención, preferiblemente la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366.

[0033] Cuando se realizaron experimentos con la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 en combinación con cepas de *Lactobacillus paracasei* diferentes, se descubrió de forma inesperada que estas combinaciones eran aún mejores que cualquiera de las cepas solas, incluso cuando las concentraciones totales de células eran idénticas. En una forma de realización, la invención se refiere a una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC12777. En otra forma de realización, la invención se refiere a una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676.

Estas combinaciones parecieron ser más eficaces que los cultivos de referencia HOLDBAC™ YM-B y HOLDBAC™ YM-C de Danisco, Dinamarca.

[0034] Por consiguiente, en una forma de realización preferida, la presente invención se refiere a composiciones antimicrobianas y más preferiblemente antifúngicas que comprenden la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 que se depositó en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (DSMZ) con el

número de depósito DSM23035 o una derivada mutante de la misma que tiene sustancialmente las mismas propiedades antifúngicas o mejoradas que la cepa depositada con el número de depósito DSM23035 y al menos una cepa de *Lactobacillus paracasei*.

Preferiblemente, al menos una cepa de *Lactobacillus paracasei* se selecciona del grupo consistente en la cepa de *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 con número de depósito DSM25612, la cepa de *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 con número de depósito DSM24651 y cepas mutantes derivadas de estas cepas depositadas, donde las cepas mutantes tienen sustancialmente las mismas propiedades antifúngicas o mejoradas que una de las cepas depositadas con el número de depósito DSM25612 o DSM24651.

[0035] En un aspecto, la invención proporciona por lo tanto una composición antimicrobiana y más preferiblemente antifúngica que comprende la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 o una derivada mutante de la misma y la cepa de *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 o una derivada mutante de la misma.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición antimicrobiana y más preferiblemente antifúngica que comprende al menos la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 o una derivada mutante de la misma y la cepa de *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 o una derivada mutante de la misma.

Dichas mutantes tienen sustancialmente las mismas propiedades antifúngicas o mejoradas que una de las cepas con el número de depósito DSM23035; DSM24651 o DSM25612.

Preferiblemente, la combinación de la cepa de *Lactobacillus paracasei* y la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* en las composiciones de la invención actúa sinérgicamente en cuanto a su actividad antimicrobiana y/o antifúngica.

[0036] La composición antifúngica comprende típicamente las bacterias en una forma concentrada, incluyendo concentrados congelados, deshidratados o liofilizados que tienen típicamente una concentración de células viables que está en el rango de 10^4 a 10^{12} ufc (unidades formadoras de colonias) por gramo de la composición incluyendo al menos 10^4 ufc por gramo de la composición, tal como al menos 10^5 ufc/g, por ejemplo al menos 10^6 ufc/g, tal como al menos 10^7 ufc/g, por ejemplo al menos 10^8 ufc/g, tal como al menos 10^9 ufc/g, por ejemplo al menos 10^{10} ufc/g, tal como al menos 10^{11} ufc/g.

Así, la composición de la invención preferiblemente está presente en una forma congelada, deshidratada o liofilizada, por ejemplo como un cultivo de inoculación directa a cuba (DVS). Sin embargo, como se utiliza en este caso, la composición también puede ser un líquido que se obtiene después de la suspensión de los concentrados congelados, deshidratados o liofilizados en un medio líquido tal como agua o tampón PBS.

Cuando la composición de la invención es una suspensión, la concentración de células viables está en el rango de 10^4 a 10^{12} ufc (unidades formadoras de colonias) por ml de la composición incluyendo al menos 10^4 ufc por ml de la composición, tal como al menos 10^5 ufc/ml, por ejemplo al menos 10^6 ufc/ml, tal como al menos 10^7 ufc/ml, por ejemplo al menos 10^8 ufc/ml, tal como al menos 10^9 ufc/ml, por ejemplo al menos 10^{10} ufc/ml, tal como al menos 10^{11} ufc/ml.

[0037] La composición puede contener como otros componentes aditivos crioprotectores y/o convencionales que incluyen nutrientes tales como extractos de levadura, azúcares y vitaminas, por ejemplo vitamina A, C, D, K o vitaminas de la familia de la vitamina B. Los crioprotectores adecuados que se pueden añadir a las composiciones de la invención son componentes que mejoran la tolerancia al frío de los microorganismos, tales como manitol, sorbitol, tripolifosfato de sodio, xilitol, glicerol, rafinosa, maltodextrina, eritritol, treitol, trehalosa, glucosa y fructosa. Otros aditivos pueden incluir, por ejemplo, carbohidratos, sabores, minerales, enzimas (por ejemplo cuajo, lactasa y/o fosfolipasa).

[0038] En composiciones de la invención que comprenden la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y una cepa de *Lactobacillus paracasei*, la proporción entre la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y la cepa de *Lactobacillus paracasei*, por ejemplo la proporción de la concentración o número de bacterias *Lactobacillus rhamnosus* y la concentración o número de bacterias *Lactobacillus paracasei*, preferiblemente es de 1:100 a 100:1, preferiblemente 1:10 a 10:1.

[0039] La composición antifúngica de la presente invención se puede utilizar en relación con cualquier alimento, pienso y producto farmacéutico que sea susceptible a la degradación microbiana y/o contaminación con levaduras y mohos. Estos incluyen, pero de forma no limitativa, frutas y verduras, incluyendo productos derivados, cereales y productos derivados de los cereales, productos lácteos, carne, carne de ave y pescado y marisco. En formas de realización particularmente preferidas, la composición se usa en relación con productos lácteos y/o carne y carne de ave. En una forma de realización preferida, las composiciones de la invención son para un uso como aditivo en la preparación de productos lácteos, tales como yogur, tvarog, crema agria, queso crema y similar.

[0040] En una forma de realización preferida, las composiciones de la invención se usan contra hongos, tales como levaduras y mohos. Esto significa que las composiciones se usan para inhibir y/o evitar el crecimiento de hongos que causan contaminación en los procesos de la industria láctea, en particular en procesos de fermentación de la leche. Las composiciones de la presente invención pueden utilizarse, por ejemplo, para inhibir y/o evitar el crecimiento de levaduras, tales como levaduras de los géneros *Kluyveromyces* (por ejemplo, *K. marxianus*, *K. lactis*), *Pichia* (por ejemplo, *P. fermentans*), *Yarrowia* (por ejemplo, *Y. lipolytica*), *Candida* (por

ejemplo, *C. sake*), y similares; o mohos, tales como mohos del género *Penicillium* (por ejemplo, *P. nalgiovense*, *P. commune*, *P. crustosum*, *P. brevicompactum*, *P. glabrum*), *Mucor* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus* (por ejemplo, *A. versicolor*), *Debaryomyces* (por ejemplo, *D. hansenii*), y similares.

Se prefiere especialmente el uso de las composiciones de la invención para inhibir y/o evitar el crecimiento de las especies *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica*, *Penicillium nalgiovense*, *Cladosporium* spp., *Penicillium commune*, *Mucor* spp., *Penicillium brevicompactum*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium crustosum*, *Kluyveromyces lactis*, y/o *Debaryomyces hansenii*.

[0041] La composición antifúngica según el segundo aspecto de la presente invención también se puede usar como un producto farmacéutico, preferiblemente uno para tratar infecciones con hongos patógenos, tales como levaduras patógenas.

[0042] En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un alimento, pienso o producto farmacéutico que comprende una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* según el primer aspecto de la invención o una composición antifúngica según el segundo aspecto de la invención.

[0043] En una forma de realización más preferida, tal producto alimenticio se selecciona del grupo consistente en frutas y productos derivados de la fruta, vegetales y productos derivados vegetales, cereales y productos derivados de los cereales, productos lácteos, carne, carne de ave y pescado y mezclas de los mismos.

[0044] En una forma de realización aún más preferida, el producto alimenticio es un producto lácteo, preferiblemente un producto lácteo fermentado mesofílico o termofílico, tal como queso fresco, un yogur, una crema agria o tvarog.

[0045] En otra forma de realización preferida, el producto alimenticio es carne o carne de ave.

[0046] En una forma de realización preferida el alimento, pienso o producto farmacéutico es un producto farmacéutico.

[0047] Preferiblemente, el producto farmacéutico es un producto útil para la administración de la composición antifúngica según un segundo aspecto de la presente invención a un humano o a un animal para inhibir microorganismos patógenos y paliar los síntomas relacionados con los microorganismos patógenos.

Algunos ejemplos de tales síntomas incluyen los síntomas relacionados con la infección por levadura.

En tal forma de realización, el producto farmacéutico puede ser una forma de dosificación unitaria que comprende la composición antifúngica. Preferiblemente, la forma de dosificación unitaria es una cápsula o un comprimido. Sin embargo, la forma de dosificación unitaria también puede ser adecuada para la aplicación a las mucosas o la piel y, por lo tanto, ser en forma de pasta, crema, pomada y similares.

[0048] Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un método para la fabricación de un alimento, pienso o producto farmacéutico según el tercer aspecto de la presente invención que comprende añadir al menos una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* según el primer aspecto o una composición antifúngica según el segundo aspecto de la invención durante la producción del alimento, pienso o producto farmacéutico.

Preferiblemente, el método también comprende la etapa de controlar los parámetros de fabricación durante la fabricación de manera que la concentración de la al menos una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* permanezca constante o aumente.

[0049] En una forma de realización preferida, la concentración de la al menos una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* es al menos 1×10^6 ufc/g o cada una al menos 1×10^6 ufc/ml del alimento, pienso o producto farmacéutico, o cada una al menos 1×10^5 ufc/cm² de la superficie del alimento, pienso o producto farmacéutico.

Preferiblemente, la concentración de la al menos una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* es al menos 5×10^6 ufc/g o cada una al menos 5×10^6 ufc/ml del alimento, pienso o producto farmacéutico, o cada una al menos 5×10^5 ufc/cm² de la superficie del alimento, pienso o producto farmacéutico, tal como al menos 1×10^7 ufc/g o cada una al menos 1×10^7 ufc/ml del alimento, pienso o producto farmacéutico, o cada una al menos 1×10^6 ufc/cm² de la superficie del alimento, pienso o producto farmacéutico, tal como al menos 5×10^7 ufc/g o cada una al menos 5×10^7 ufc/ml del alimento, pienso o producto farmacéutico, o cada una al menos 5×10^6 ufc/cm² de la superficie del alimento, pienso o producto farmacéutico.

[0050] Cuando el alimento, pienso o producto farmacéutico se fabrica por adición de una composición que comprende la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 o una derivada mutante de la misma y al menos una cepa de *Lactobacillus paracasei*, la concentración de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 o la derivada mutante de la misma y/o la concentración de la al menos una cepa de *Lactobacillus paracasei* es cada una de al menos 1×10^6 ufc/g o cada una al menos 1×10^6 ufc/ml del alimento, pienso o producto farmacéutico, o cada una al menos 1×10^5 ufc/cm² de la superficie del alimento, pienso o producto farmacéutico.

Preferiblemente, la concentración de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 o la derivada mutante de la misma y/o la concentración de la al menos una cepa de *Lactobacillus paracasei* es cada una de al menos 5×10^6 ufc/g o cada una al menos 5×10^6 ufc/ml del alimento, pienso o producto farmacéutico, o cada una al menos

5x10⁵ ufc/cm² de la superficie del alimento, pienso o producto farmacéutico.

En otra forma de realización, la concentración de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 o la derivada mutante de la misma y/o la concentración de la al menos una cepa de *Lactobacillus paracasei* es cada una al menos 1x10⁸ ufc/g o cada una al menos 1x10⁸ ufc/ml del alimento, pienso o producto farmacéutico, o cada una al menos 1x10⁷ ufc/cm² de la superficie del alimento, pienso o producto farmacéutico.

[0051] En una forma de realización preferida, los parámetros de fabricación se controlan durante la fabricación de manera que la concentración de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (o la derivada mutante de la misma) y la al menos una cepa de *Lactobacillus paracasei* aumenta o permanece constante.

[0052] Una composición antifúngica según la presente invención se usa de manera más sencilla mezclándola con y/o aplicándola a un alimento pienso o producto farmacéutico mezclable, pero también debería ser eficaz para tratar la superficie de productos alimenticios sólidos, o el interior de tales productos, por ejemplo por inyección. En otras formas de realización, la composición se puede aplicar como un líquido de marinado, empanado, aderezo, glaseado, mezcla colorante y similares, el criterio clave siendo que la composición antifúngica esté disponible para la superficie sujeta a degradación bacteriana y contaminación con levaduras y mohos. En otras formas más de realización, la composición puede ponerse en contacto indirectamente con la superficie del alimento aplicando la composición al envase del alimento y luego aplicando el envase a la superficie del alimento. La cantidad óptima que se ha de usar dependerá de la composición del producto alimenticio particular que se va a tratar y del método usado para aplicar la composición a la superficie alimenticia, pero se puede determinar por simple experimentación.

[0053] En una forma de realización muy preferida, el método comprende uno o más pasos de fermentación y la al menos una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* o la composición antifúngica se pueden añadir al alimento, pienso o producto farmacéutico antes, durante o después de dichos uno o más pasos de fermentación.

[0054] Preferiblemente, el método comprende la fermentación de un sustrato, tal como un sustrato de leche, en presencia de al menos una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* según la invención durante un periodo de tiempo suficiente para la aparición de actividad antifúngica de la al menos una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* según la invención.

Esta actividad antifúngica tiene el efecto de inhibir el desarrollo de levaduras y/o mohos en el producto fermentado con la al menos una cepa.

[0055] En una forma de realización aún más preferida, el método comprende la fermentación de un sustrato de leche con un cultivo iniciador que comprende al menos una cepa de los géneros seleccionados de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*, tal como al menos una cepa de *Lactobacillus bulgaricus* y al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* o tal como al menos una cepa de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, al menos una cepa de *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris* y al menos una cepa de *Lactococcus lactis* subesp. *Diacetilactis*.

[0056] El quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso de una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* según el primer aspecto o una composición antifúngica según el segundo aspecto para la preparación de un alimento, pienso o producto farmacéutico.

Preferiblemente, el producto alimenticio producido usando la cepa de *Lactobacillus paracasei* según el primer aspecto o la composición antifúngica según el segundo aspecto es un queso, tal como un cottage, feta, cheddar, parmesano, mozzarella, emmental, danbo, gouda, edam, de tipo feta, queso azul, queso salado, camembert o brie.

[0057] El último aspecto de la invención se refiere al uso de una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* según el primer aspecto o una composición antifúngica según el segundo aspecto para inhibir el crecimiento de levaduras y mohos, en particular en productos alimenticios y piensos.

[0058] Las formas de realización de la presente invención se describen a continuación, por medio de ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1: prueba de exposición en el yogur con *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366.

[0059] Para la evaluación visual del efecto inhibitorio de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 en los distintos mohos *P. brevicompactum*, *P. commune*, *A. versicolor* y *P. crustosum*, se preparó yogur con 1,5% de grasa:

Se trató leche homogeneizada (1,5% de grasa) a 95°C±1°C durante 5 min. en botellas de 1 L al baño maría y se enfrió inmediatamente. Un cultivo iniciador comercial (F-DVS YF-L901 obtenible de Chr.Hansen A/S, Dinamarca) se inoculó al 0,02%. También se inoculó a la leche con HOLDBAC™ YM-B (20DCU/100l) o *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (1x10⁷ ufc/ml) y se usó una botella como referencia y sólo se inoculó

con cultivo iniciador.

[0060] La leche se fermentó a $43^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta que se alcanzó un pH de 4.60 ± 0.1 . El yogur resultante se vertió en vasos (100 g) y se almacenó a $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

[0061] Un día después de la preparación del yogur, se inocularon diferentes mohos como contaminantes de superficie en vasos duplicados de yogur con un punto en la superficie del yogur con un objetivo de 100 esporas/punto. El crecimiento de los mohos se evaluó visualmente después del almacenamiento durante 45 días a $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

[0062] El resultado de la prueba con yogur se presenta en la figura 1, que muestra que *P. brevicompactum* (M1), *P. commune* (M6), *A. versicolor* (M7) y *P. crustosum* (M10) crecen bien en yogur hecho a partir de leche fermentada sólo con el cultivo iniciador YF-L901 (fila superior) o con el cultivo iniciador y el cultivo HOLDBAC™ YM-B (fila intermedia). En cambio, cuando *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 estuvo presente durante la fermentación de la leche (fila inferior) el crecimiento de todos los mohos evaluados se vio inhibido.

Ejemplo 2: determinaciones cuantitativas del efecto inhibitorio de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 contra *Debaryomyces hansenii*.

[0063] Para una evaluación cuantitativa del efecto inhibitorio de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 en *D. hansenii*, se preparó yogur:

Se termotrató leche homogeneizada (1,5% de grasa) a $95^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5 min. en botellas de 1 L al baño maría. La leche se enfrió inmediatamente. Se inoculó a cada botella un cultivo iniciador comercial (F-DVS YF-L901 obtenible de Chr.Hansen A/S, Dinamarca) al 0,02%. La leche también se inoculó con HOLDBAC™ YM-B (20 DCU/100L) o HOLDBAC™ YM-C (10 DCU/100L) o *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (1×10^7 ufc/g) y se usó una botella como referencia y sólo se inoculó con cultivo iniciador.

[0064] La leche se fermentó a $43^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta que se alcanzó un pH de 4.60 ± 0.05 . El yogur resultante se vertió en vasos (aprox. 75 ml) y se almacenó a $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

[0065] El día después de la preparación del yogur, los vasos se inocularon por duplicado con 0,75 ml/vaso de levadura en un objetivo de 20 ufc/g. La levadura se dispersó de forma homogénea en el yogur. Los vasos se almacenaron bajo tapa a $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y se analizaron a intervalos adecuados para detectar el nivel de contaminación de *D. hansenii* mediante la preparación en placa de 1 ml de yogur y otras diluciones de factor 1 apropiadas hechas en peptona salina sobre agar extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol (YGC) seguida de incubación aeróbica durante 5 días a 25°C .

[0066] Como se ilustra en la figura 2, el crecimiento de *D. Hansenii* fue inhibido en presencia de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 cuando se inoculó junto con el cultivo iniciador YF-L901 antes de la fermentación. La cepa provocada causó una inhibición significativamente más alta que los cultivos comerciales, HOLDBAC™ YM-B y HOLDBAC™ YM-C.

[0067] Ejemplo 3: determinaciones semicuantitativas del efecto inhibitorio de *Lb. paracasei* CHCC14676 y *Lb. rhamnosus* CHCC5366 solas y en combinación contra distintos mohos contaminantes.

[0068] Para las evaluaciones semicuantitativas de *Lb. paracasei* CHCC14676 y *Lb. rhamnosus* CHCC5366 solas y en combinación, se utilizó un ensayo en agar, parecido al proceso de fabricación y producto de yogur:

Se termotrató leche homogeneizada (1,5% p/v de grasa) a 95°C durante cinco minutos y se enfrió inmediatamente. Un cultivo iniciador comercial (F-DVS YC-350 obtenible de Chr. Hansen A/S, Dinamarca) se inoculó al 0,02%, y la leche se distribuyó a botellas de 220 ml. Las botellas además se inocularon con *Lb. paracasei* CHCC14676, *Lb. rhamnosus* CHCC5366 y una combinación de las dos cepas, respectivamente, en concentraciones totales de 1×10^7 ufc/ml. Una botella sin más inoculación que el cultivo iniciador se usó como referencia. Además, 5% de un indicador de pH de púrpura de bromocresol y verde de bromocresol se añadió a todas las botellas para obtener una indicación de la velocidad de acidificación, y para obtener un color azul/verde de los medios que haría que el crecimiento posterior de levaduras y mohos objetivo fuera más fácilmente detectable. Todas las botellas se incubaron al baño maría a $43 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y se fermentaron a estas condiciones hasta que se alcanzó un pH de 4.60 ± 0.1 . Después de la fermentación, las botellas se enfriaron inmediatamente en hielo y se agitaron enérgicamente para romper la cuajada. Después, la leche fermentada se calentó a una temperatura de 40°C y se añadió a 40 ml de una solución de agar estéril al 5% que había sido derretida y enfriada hasta 60°C . Esta solución luego se vertió en placas de Petri estériles y las placas se secaron en una mesa de flujo laminar durante 30 min.

[0069] Se depositaron en las placas pequeñas cantidades de suspensiones de esporas completamente cultivadas en diluciones apropiadas de los mohos seleccionados *Penicillium nalgiovense* (10x), *Penicillium commune* (100x), *Aspergillus versicolor* (100x) y *Penicillium crustosum* (100x). Las placas se incubaron a 7°C y se examinó el crecimiento de moho a intervalos adecuados y regulares.

[0070] Los resultados del ensayo en agar se presentan en la figura 3, que muestra que todos los mohos evaluados crecieron muy bien en las placas de agar a partir de leche fermentada solo con el cultivo iniciador (referencia). Sin embargo, cuando *Lb. paracasei* CHCC14676 o *Lb. rhamnosus* CHCC5366 estaban presentes durante la fermentación de la leche, las placas resultantes redujeron considerablemente el crecimiento de todos los mohos. Además, cuando *Lb. paracasei* CHCC14676 y *Lb. rhamnosus* CHCC5366 estaban presentes en combinación durante la fermentación de la leche, se observó una inhibición incluso más fuerte para *Penicillium commune*, *Aspergillus versicolor* y *Penicillium crustosum* depositadas en pequeñas cantidades en las placas.

Ejemplo 4: prueba de exposición con *Lb. rhamnosus* CHCC5366 y sorbato de potasio.

[0071] Se usó leche pasteurizada con un 0,17% grasa para preparar tres lotes diferentes de yogur utilizando el cultivo iniciador comercial al que se hace referencia en el ejemplo 1. El cultivo iniciador se inoculó al 0,013%.

Antes de la fermentación, se añadió sorbato de potasio (0,023%) al primer lote, se añadió *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (1×10^7 ufc/g) al segundo lote, mientras que el tercer lote se usó como una referencia que contenía sólo el cultivo iniciador. La fermentación se efectuó a 43°C hasta que se alcanzó un pH de 4.55. Después de alcanzar el pH de 4.55, el yogur se almacenó a 7°C.

[0072] Los tres tipos diferentes de yogur se distribuyeron en vasos pequeños con aprox. 100 g en cada uno y su superficie se inoculó con cada uno de los mohos siguientes previamente aislados de productos lácteos fermentados pasados para alcanzar una inoculación objetivo de aprox. 1000 esporas /vaso:

Penicillium solitum,
Penicillium palitans,
Penicillium discolor,
Penicillium spathulatum,
Penicillium commune,
Penicillium crustosum,
Penicillium paneum,
Penicillium roqueforti,

[0073] Los yogures se incubaron a 7°C durante 60 días, y el crecimiento de los distintos mohos se supervisó visualmente mediante la toma de fotografías al final del periodo de 60 días.

[0074] Los resultados presentados en la figura 4 demuestran que la presencia de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 redujo espectacularmente el crecimiento y la formación del color de verde/azul típico de los distintos mohos en el yogur durante 60 días de almacenamiento a 7°C. El efecto inhibitorio de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 en el alcance del crecimiento y la formación de color de los mohos resultó ser considerablemente más fuerte que el efecto ejercido por la adición de 0,023% de sorbato de potasio.

Ejemplo 5: prueba de exposición en yogur griego con *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 en combinación.

[0075] Para la evaluación visual del efecto inhibitorio de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 en combinación sobre *Mucor* ssp, se preparó sustancialmente yogur griego de la siguiente manera:

Se inoculó en leche pasteurizada un 1,5% de grasa un cultivo iniciador comercial (F-DVS YF-L901 obtenible de Chr. Hansen A/S, Dinamarca) al 0,02%. Un lote inoculado solamente con cultivo iniciador se usó como referencia. Otro lote también se inoculó con una combinación de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5×10^6 ufc/g) y la cepa de *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5×10^6 ufc/g).

[0076] La leche se fermentó a $43^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ a un pH final de 4.55 (6-7 horas). Posteriormente, el yogur se enfrió a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ con una contrapresión de 2 bares y se almacenó a $6^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

[0077] Un día después de la preparación del yogur, se inoculó *Mucor* ssp. como contaminante de superficie en vasos duplicados de yogur aplicando un punto en la superficie del yogur con una concentración de inoculación objetivo de 100 esporas/punto. El crecimiento del moho se evaluó visualmente después del almacenamiento durante 15 días a $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

[0078] Los resultados de la prueba con yogur griego se presentan en la figura 5, que muestra que *Mucor* ssp. crece bien en yogur hecho a partir de leche fermentada solamente con el cultivo iniciador (vaso de la izquierda). En cambio, cuando *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 estuvieron presentes durante la fermentación de la leche (vaso de la derecha) el crecimiento de *Mucor* ssp. fue inhibido.

Ejemplo 6: segunda prueba de exposición en yogur griego con una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676.

[0079] Para la evaluación visual del efecto inhibitorio de la combinación de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 en el moho de pan negro *Rhizopus stolonifer*, el yogur griego se preparó sustancialmente de la siguiente manera:

Se inoculó en leche pasteurizada con un 1,5% de grasa un cultivo iniciador comercial (F-DVS YF-L901 obtenible de Chr.Hansen A/S, Dinamarca) al 0,02 %. También se inoculó en la leche HOLDBAC™ YM-B (10 DCU/100 l), con la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (1×10^7 ufc/g), o con una combinación de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5×10^6 ufc/g) y la cepa de *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5×10^6 ufc/g). Un lote se usó como referencia y sólo se inoculó con cultivo iniciador.

[0080] La leche se fermentó a $43^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ hasta llegar a un pH final de 4.55 (6-7 horas). Posteriormente, el yogur se enfrió a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ con una contrapresión de 2 bares y se almacenó a $6^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

[0081] Un día después de la preparación del yogur, se inoculó *Rhizopus stolonifer* como contaminante de superficie en vasos duplicados de yogur aplicando un punto en la superficie del yogur con una contaminación objetivo de 100 esporas/punto. El crecimiento del moho se evaluó visualmente después del almacenamiento durante 42 días a $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

[0082] El resultado de la prueba con el yogur griego se presenta en la figura 6, que muestra que *Rhizopus stolonifer* crece bien en yogur hecho a partir de leche fermentada solamente con el cultivo iniciador ("R", es decir, referencia) o con el cultivo iniciador y el cultivo HOLDBAC™ YM-B (YM-B). Sin embargo, cuando el *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366) estuvo presente, el crecimiento de *Rhizopus stolonifer* fue inhibido significativamente. Cuando *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 estuvieron ambos presentes durante la fermentación de la leche (5366+14676) el crecimiento de *Rhizopus stolonifer* fue inhibido casi completamente.

Ejemplo 7: prueba de exposición en queso blanco en salmuera con *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 en combinación.

[0083] Para la evaluación cuantitativa del efecto inhibitorio de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 en combinación contra *Saccharomyces cerevisiae*, se preparó queso blanco en salmuera:

Se inoculó en leche pasteurizada y normalizada un cultivo iniciador comercial (FD-DVS SafeIT-1 obtenible de Chr.Hansen A/S, Dinamarca) a 40 U por 1000 l de leche. También se inoculó en la leche HOLDBAC™ YM-B (10 DCU/100 l) o con una combinación de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5×10^6 ufc/g) y la cepa de *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5×10^6 ufc/g). Un lote se usó como referencia y solamente se inoculó con cultivo iniciador. La leche se trató con cuajo a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ usando Chy-Max plus (obtenido de Chr. Hansen A/S, Dinamarca) con 220 ml por 1000 l durante 90 min. antes del corte. A pH 6.0 la cuajada se bombeó hasta los mohos y se dejó drenar hasta alcanzar un pH final de 4.8-4.7 (20-24 horas). Los quesos se colocaron en latas con salmuera fría (8%) y se almacenaron a $5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

[0084] Un día después de la preparación del queso blanco en salmuera, se inoculó levadura a las latas por duplicado con un objetivo de 20 ufc/ml. La levadura se dispersó uniformemente en la solución salina.

Los vasos se almacenaron bajo tapa a $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante hasta 40 días y se analizaron 10 g a intervalos adecuados para detectar el nivel de contaminación de *Saccharomyces cerevisiae* mediante la preparación en placa apropiada de diluciones de factor 1 hechas en peptona salina sobre agar extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol (YGC) seguida de incubación aeróbica durante 5 días a 25°C .

[0085] Como se ilustra en la figura 7, el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* fue inhibido en presencia de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 en combinación cuando se inocularon junto con el cultivo iniciador SafeIT-1. Las cepas provocaron una inhibición significativamente más alta que el cultivo disponible comercialmente, HOLDBAC™ YM-B.

Ejemplo 8: segunda prueba de exposición en queso blanco en salmuera con *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 en combinación.

[0086] Para la evaluación cuantitativa del efecto inhibitorio de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 en combinación contra *Kluyveromyces marxianus*, se preparó queso blanco en salmuera como se describe en el ejemplo 1, con la excepción que se inoculó *Kluyveromyces marxianus* en las latas como levadura contaminante.

[0087] Como se ilustra en la figura 8, el crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* fue inhibido en presencia de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 en combinación cuando se inocularon junto con el cultivo iniciador SafeIT-1. Las cepas provocaron una inhibición significativamente más alta que el cultivo disponible comercialmente, HOLDBAC™ YM-B.

Ejemplo 9: tercera prueba de exposición en queso blanco en salmuera con *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 en combinación.

[0088] Para la evaluación visual del efecto inhibitorio de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 en combinación contra *P. commune*, se preparó queso blanco en salmuera como se describe en el ejemplo 1.

[0089] 7 días después de la preparación del queso blanco en salmuera, el queso se retiró de la solución salina y se inoculó *P. commune* como contaminante de superficie en quesos duplicados con tres puntos en la superficie del queso con un objetivo de 100 esporas/punto. El crecimiento de dos aislados de *P. commune* diferentes se evaluó visualmente después de almacenamiento durante 12 días a $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ y, posteriormente, 16 días a $12^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$

[0090] Los resultados de la prueba del queso blanco en salmuera se presentan en la figura 9, que muestra que los dos aislados de *P. commune* crecen bien en el queso blanco en salmuera hecho a partir de leche inoculada sólo con el cultivo iniciador (izquierda).

En cambio, cuando *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 estuvieron presentes durante la producción de queso (derecha), el crecimiento de *P. commune* fue fuertemente inhibido.

Ejemplo 10: prueba de exposición en queso blanco en salmuera con *Lactobacillus paracasei* CHCC5366

[0091] Para la evaluación visual del efecto inhibitorio de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 contra *P. crustosum*, se preparó queso blanco en salmuera:

Se inoculó leche pasteurizada y normalizada con un cultivo iniciador comercial (FD-DVS SafeIT-1 obtenible de Chr.Hansen A/S, Dinamarca) a 40 U por 1000 l de leche. La leche se inoculó además con HOLDBAC™ YM-B (10 DCU/100 l) o la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (1×10^7 ufc/g). Un lote se usó como referencia y sólo se le inoculó el cultivo iniciador. La leche se trató con cuajo a $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ utilizando Chy-Max plus (obtenido de Chr. Hansen A/S, Dinamarca) con 220 ml por 1000 l durante 90 min. antes del corte. A pH 6.0, la cuajada se bombeó hasta los mohos y se dejó drenar hasta alcanzar un pH final de 4.8-4.7 (20-24 horas). Los quesos se colocaron en latas con salmuera fría (8%) y se almacenaron a $5^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

[0092] 7 días después de la preparación del queso blanco en salmuera, el queso se retiró de la solución salina y se inoculó *P. Crustosum* como contaminante de superficie en quesos duplicados con tres puntos en la superficie del queso con un objetivo de 100 esporas/punto. El crecimiento del aislado de *P. crustosum* se evaluó visualmente después de almacenamiento durante 11 días a $12^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, y, posteriormente, 16 días a $12^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$

[0093] Los resultados de la prueba de queso blanco en salmuera se presentan en la figura 10, que muestra que el aislado de *P. Crustosum* crece bien en el queso blanco en salmuera hecho a partir de leche inoculada sólo con cultivo iniciador (izquierda). En cambio, cuando *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 estuvo presente durante la producción (derecha) de queso, el crecimiento de *P. Crustosum* fue inhibido.

Ejemplo 11: prueba de exposición en yogur con *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y CHCC14676 contra *Penicillium paneum*

[0094] Para la evaluación visual del efecto inhibitorio de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 sola o en combinación con *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 en el moho *P. paneum*, se preparó yogur con 1,5% de grasa:

Se termotrató leche homogeneizada (1,5% de grasa) a $95^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5 min. en botellas de 1 L al baño maría y se enfrió inmediatamente. Se inoculó un cultivo iniciador comercial (F-DVS YF-L901 obtenible de Chr. Hansen A/S, Dinamarca) al 0,02%. También se inoculó a la leche HOLDBAC™ YM-B (20DCU/100L), *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (1×10^7 ufc/ml) solo, o una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5×10^6 ufc/ml) y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5×10^6 ufc/ml). Se usó una botella como referencia y sólo se le inoculó cultivo iniciador.

[0095] La leche se fermentó a $43^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta que se alcanzó un pH de 4.60 ± 0.1 . El yogur resultante se vertió en vasos (100 g) y se almacenó a $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

[0096] Un día después de la preparación de yogur, se inocularon distintos mohos como contaminantes de superficie en vasos duplicados de yogur con un punto en la superficie del yogur con un objetivo de 100 esporas/punto. El crecimiento de los mohos se evaluó visualmente después de almacenamiento durante 28 días a $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$

[0097] El resultado de la prueba con yogur se presenta en la figura 11, que muestra que *P. Paneum* crece bien en yogur hecho a partir de leche fermentada sólo con el cultivo iniciador YF-L901 o con el cultivo iniciador y el cultivo HOLDBAC™ YM-B. En cambio, cuando el *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 estuvo presente durante la fermentación de leche, el crecimiento de *P. Paneum* se vio fuertemente reducido, y la combinación de

Lactobacillus rhamnosus CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 causó una inhibición del crecimiento incluso más fuerte que *P. Paneum*.

Ejemplo 12: prueba de exposición en yogur con *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y CHCC14676 a temperaturas de almacenamiento diferentes

[0098] Para la evaluación visual del efecto inhibitorio de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 sola o en combinación con *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 en el moho *P. crustosum* a temperaturas de almacenamiento diferentes, se preparó yogur con 1,5% de grasa:

Se sometió a leche homogeneizada (1,5% de grasa) a $95^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5 min. en botellas de 1 L al baño maría y se enfrió inmediatamente. Un cultivo iniciador comercial (F-DVS YF-L901 obtenible de Chr. Hansen A/S, Dinamarca) se inoculó al 0,02%. A la leche también se inoculó HOLDBAC™ YM-B (20 DCU/100L), *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (1×10^7 ufc/ml) solo, o una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5×10^6 ufc/ml) y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5×10^6 ufc/ml). Se usó una botella como referencia y sólo se le inoculó cultivo iniciador.

[0099] La leche se fermentó a $43^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta que se alcanzó un pH de 4.60 ± 0.1 . El yogur resultante se vertió en vasos (100 g) y se almacenó a $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

[0100] Un día después de la preparación del yogur, se inoculó *Penicillium crustosum* como contaminante de superficie en vasos duplicados de yogur con un punto en la superficie del yogur con un objetivo de 100 esporas/punto. El crecimiento de los mohos se evaluó visualmente después de almacenamiento durante 36 días a $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $12^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ o $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

[0101] El resultado de la prueba con yogur se presenta en la figura 12, que muestra que *P. Crustosum* crece bien en yogur hecho a partir de leche fermentada sólo con el cultivo iniciador YF-L901 o con el cultivo iniciador y el cultivo HOLDBAC™ YM-B a cualquier temperatura de almacenamiento.

En cambio, cuando *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 solo o en combinación con *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 estuvo presente durante la fermentación de la leche, el crecimiento de *P. Crustosum* fue completamente inhibido durante el almacenamiento tanto a $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ como a $12^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 36 días.

Tras el almacenamiento a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, el crecimiento de *P. crustosum* fue fuertemente reducido en presencia de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 e incluso más fuerte en presencia de la combinación de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676.

DEPÓSITOS Y SOLUCIÓN EXPERTA

[0102] El solicitante pide que una muestra de los microorganismos depositados mencionados a continuación sólo pueda estar disponible para un experto, hasta la fecha en la que se conceda la patente.

[0103] La cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 se depositó a fecha de 14-10-2009 en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig y se le asignó el n° de depósito DSM23035.

[0104] La cepa de *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 se depositó a fecha de 15-03- 2011 en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig y se le asignó el n° de depósito DSM24651.

[0105] La cepa de *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 se depositó a fecha de 02-02-2012 en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig y se le asignó el n° de depósito DSM25612.

[0106] El depósito se hizo según el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes.

REFERENCIAS

[0107]

EP0221499

EP0576780

EP1442113

US5,378,458

EP11161609.0

Kosikowski, F.V. Y Mistry, V.V., "Cheese and Fermented Milk Foods", 1997, 3ª Ed. F.V. Kosikowski, L.L.C. Westport, CT

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Lactobacillus rhamnosus* seleccionada del grupo consistente en la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 que fue depositada en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (DSMZ) con el número de depósito DSM23035 y cepas mutantes derivadas de la misma, donde las cepas mutantes tienen sustancialmente las mismas propiedades antifúngicas o mejoradas que la cepa con el número de depósito nº DSM23035.
2. Composición antifúngica que comprende al menos una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* según la reivindicación 1.
3. Composición antifúngica según la reivindicación 2 que comprende además al menos una cepa de *Lactobacillus paracasei*.
4. Composición antifúngica según la reivindicación 3, donde la al menos una cepa de *Lactobacillus paracasei* se selecciona del grupo consistente en *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 con número de depósito DSM24651 y *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 con número de depósito DSM25612 y cepas mutantes derivadas de las mismas, donde las cepas mutantes tienen sustancialmente las mismas propiedades antifúngicas o mejoradas que una de las cepas depositadas con el número de depósito DSM24651 o DSM25612.
5. Alimento, pienso o producto farmacéutico que comprende una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* según la reivindicación 1 o una composición antifúngica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.
6. Producto alimenticio según la reivindicación 5 que incluye una cantidad de una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* según la reivindicación 1 eficaz para impartir propiedades antifúngicas al producto alimenticio.
7. Producto alimenticio según la reivindicación 5 o 6, donde el producto alimenticio se selecciona del grupo consistente en frutas y productos derivados de fruta, vegetales y productos derivados vegetales, cereales y productos derivados de los cereales, productos lácteos, carne, carne de ave y pescado y marisco y mezclas de los mismos.
8. Producto alimenticio según la reivindicación 7, donde el producto alimenticio es un producto lácteo y el producto lácteo es un producto lácteo fermentado mesofílico o termofílico, tal como yogur.
9. Método para la producción de un alimento, pienso o producto farmacéutico que comprende añadir al menos una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* según la reivindicación 1 o una composición antifúngica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 al alimento, pienso o producto farmacéutico durante la producción y controlar los parámetros de producción durante la producción de manera que la concentración de la al menos una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* permanezca constante o aumente.
10. Método según la reivindicación 9, donde la concentración de la al menos una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* es al menos 1×10^6 ufc/g o cada una al menos 1×10^6 ufc/ml de alimento, pienso o producto farmacéutico, o al menos 1×10^5 ufc/cm² de la superficie del alimento, pienso o producto farmacéutico.
11. Método según la reivindicación 9, que comprende
 - (a) añadir la composición antifúngica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 durante la producción del alimento, pienso o producto farmacéutico de manera que la concentración de la al menos una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* y/o al menos una cepa de *Lactobacillus paracasei* sea cada una de al menos 1×10^6 ufc/g o al menos 1×10^6 ufc/ml del alimento, pienso o producto farmacéutico, o al menos 1×10^5 ufc/cm² de la superficie del alimento, pienso o producto farmacéutico, y
 - (b) controlar los parámetros de producción durante la producción de manera que la concentración de la al menos una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* y/o la al menos una cepa de *Lactobacillus paracasei* aumente o permanezca constante.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde el método comprende uno o más pasos de fermentación.
13. Método según la reivindicación 12, donde el método comprende fermentar un sustrato de leche con un cultivo iniciador que comprende al menos una cepa de los géneros seleccionados de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*.
14. Uso de una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* según la reivindicación 1 o una composición antifúngica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 para la preparación de un producto alimenticio, pienso o fármaco.

15. Uso no médico de una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* según la reivindicación 1 o una composición antifúngica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 para la inhibición del crecimiento de levaduras y mohos.

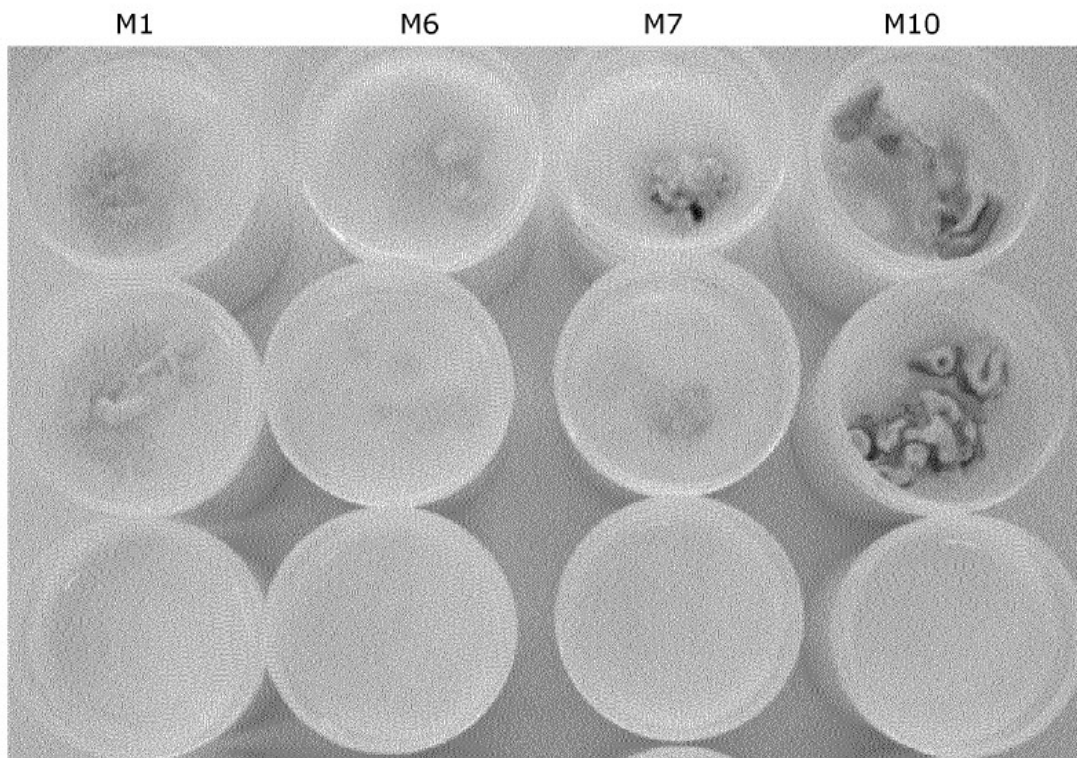


Figura 1

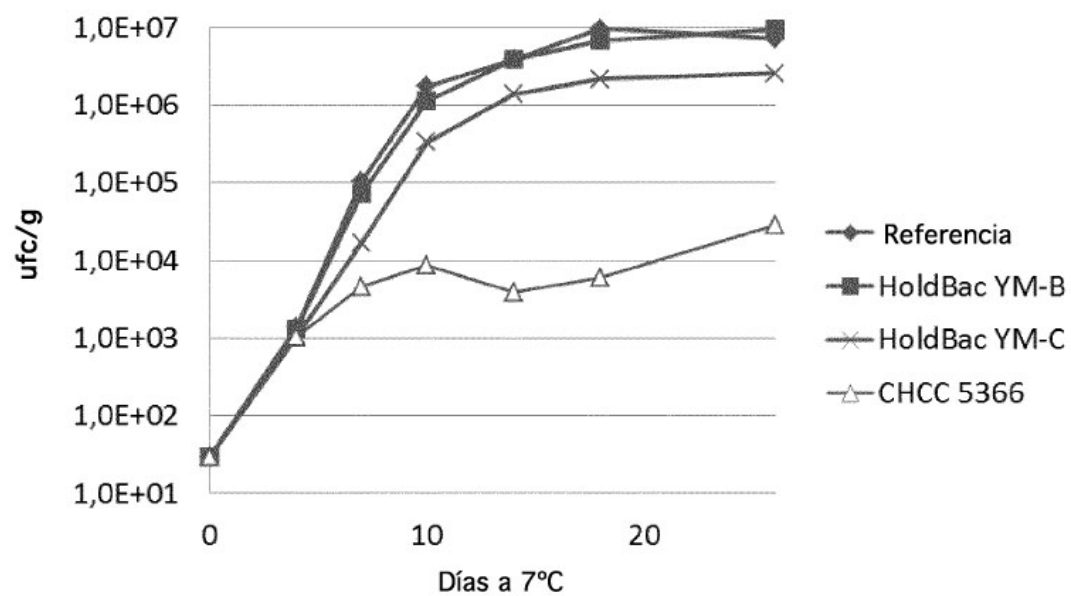


Figura 2

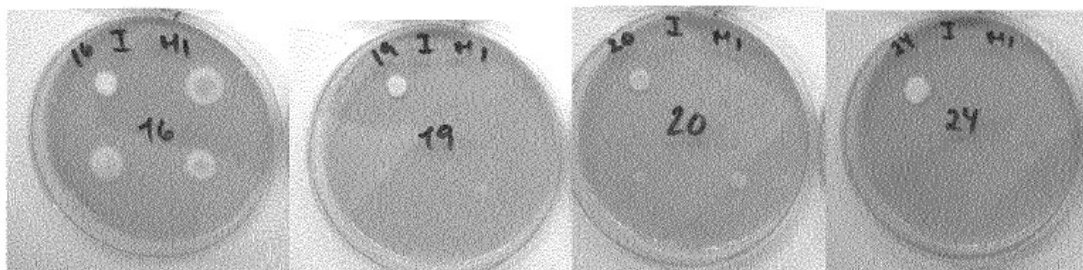


Figura 3

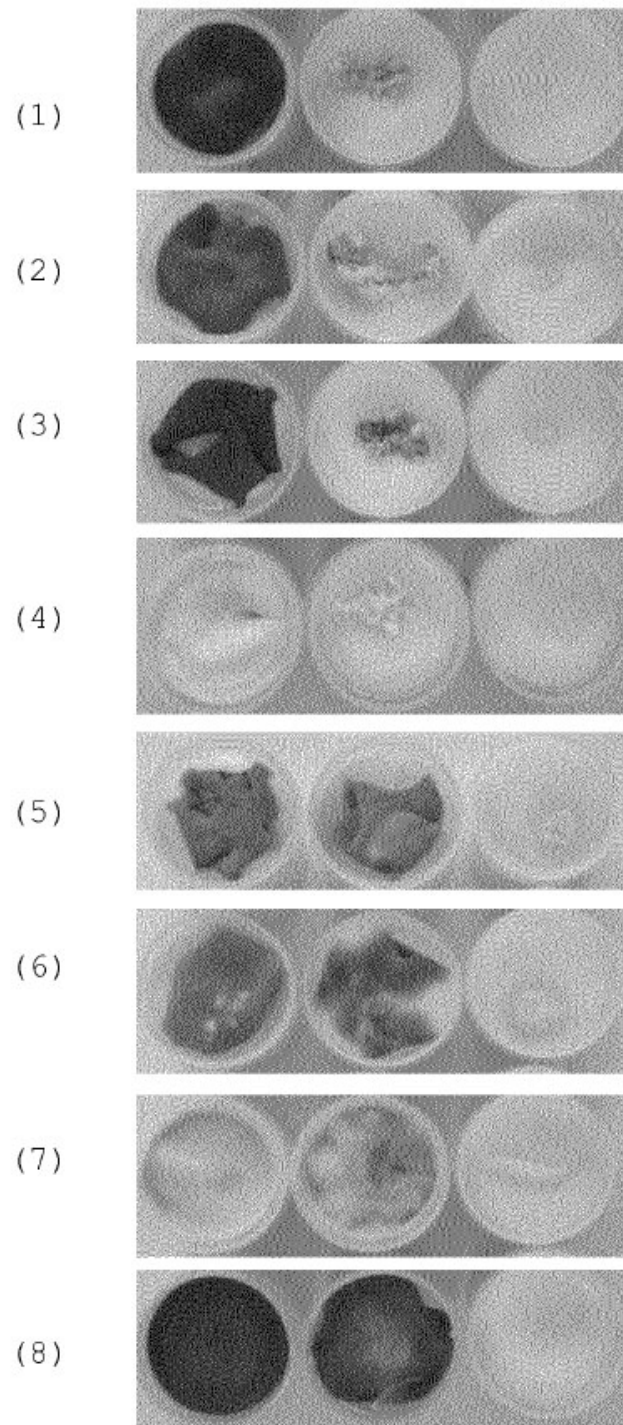


Figura 4

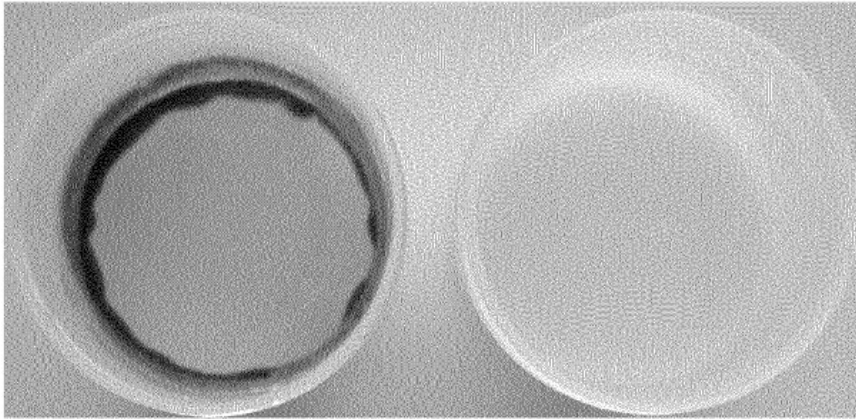


Figura 5

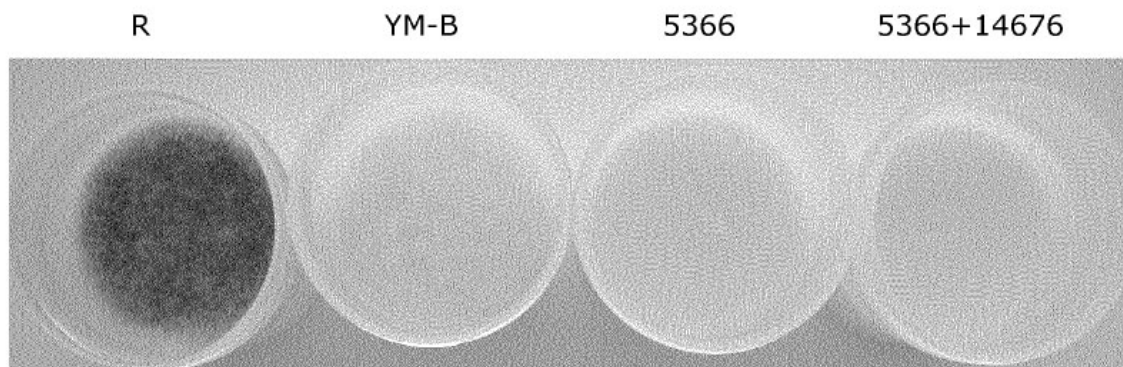


Figura 6

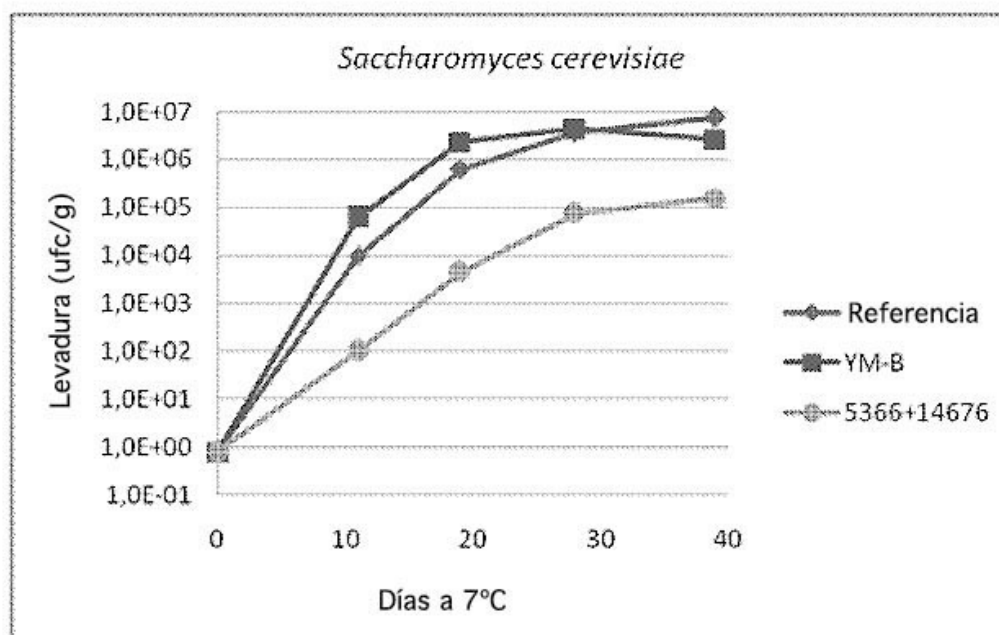


Figura 7

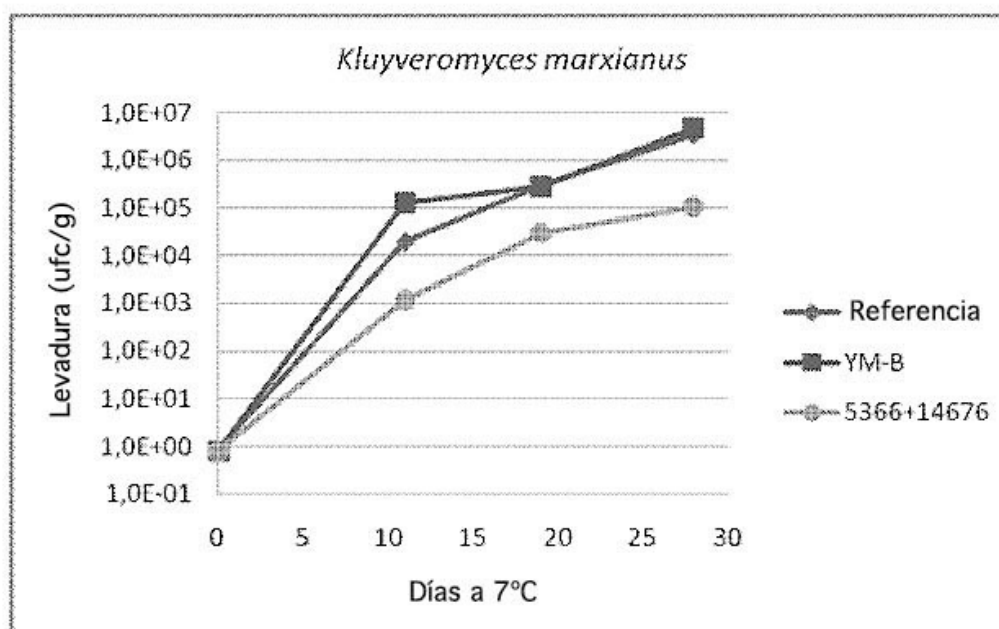


Figura 8

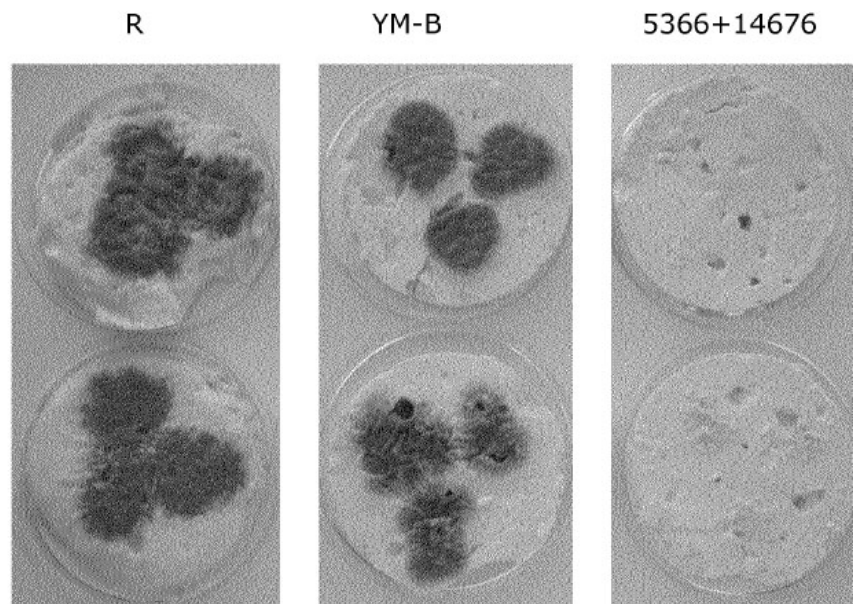


Figura 9

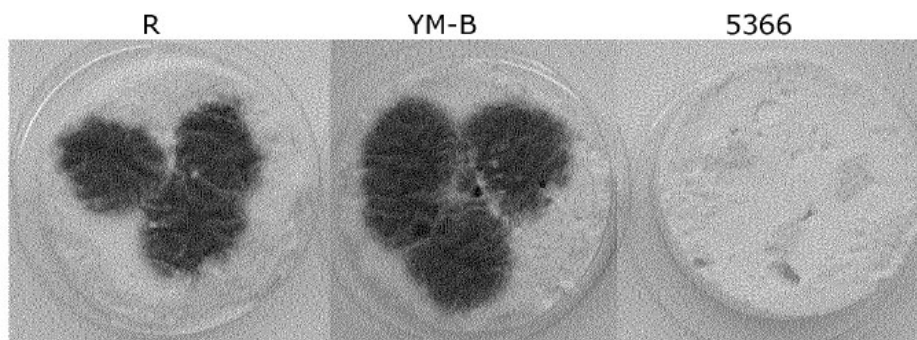


Figura 10

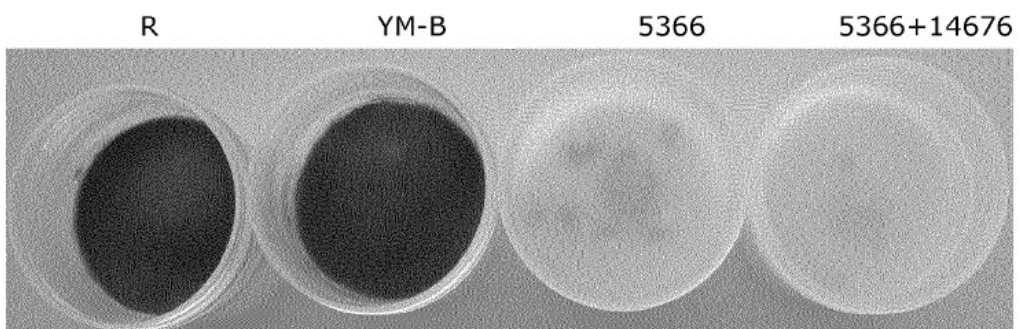


Figura 11

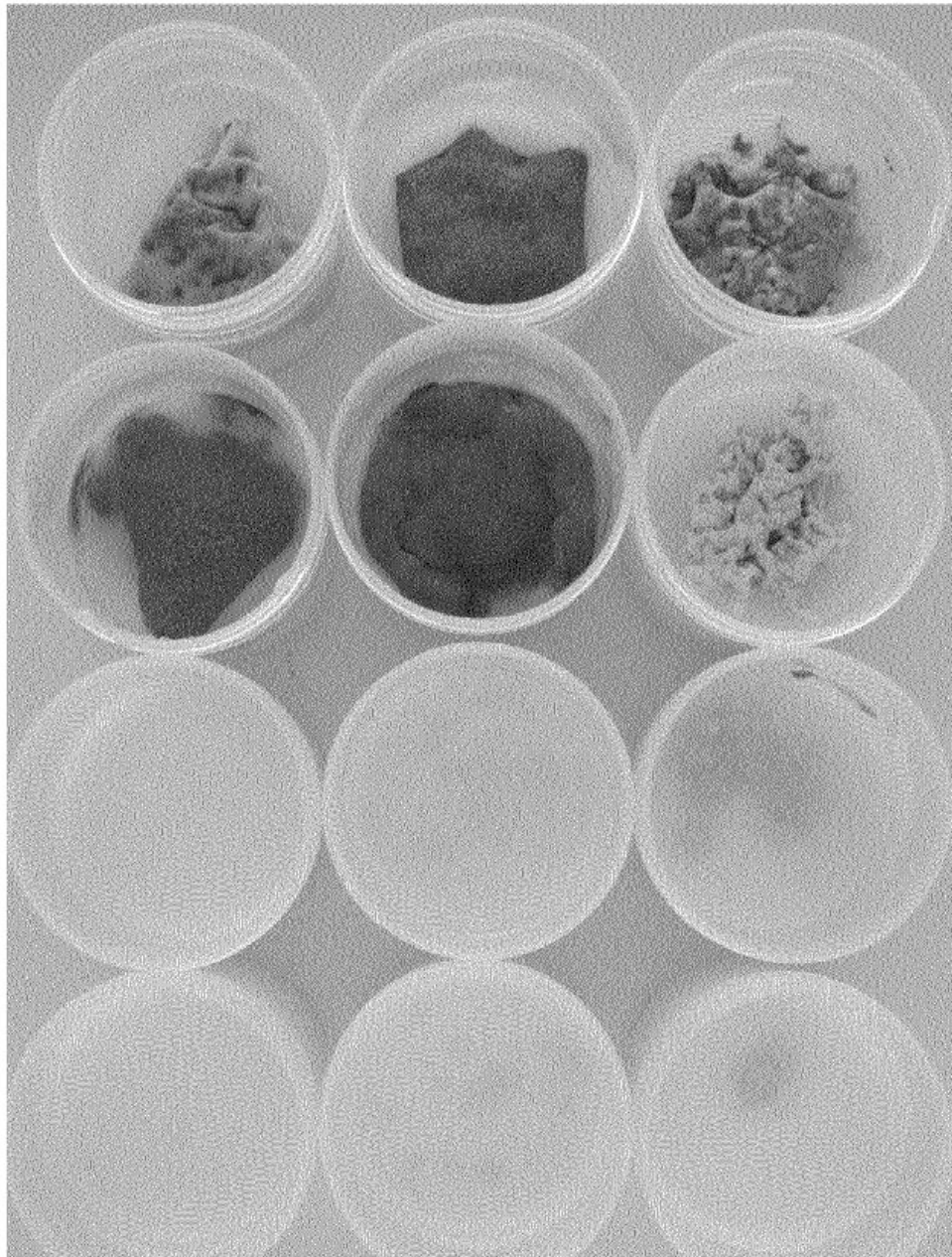


Figura 12