

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 631 908**

51 Int. Cl.:

C12N 1/00 (2006.01)
A23L 3/00 (2006.01)
A23B 4/12 (2006.01)
A23B 4/22 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
A23C 9/158 (2006.01)
A23L 3/3571 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2008** **PCT/EP2008/053157**
87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2008** **WO08113781**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2008** **E 08717894 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017** **EP 2132297**

54 Título: **Una cepa nueva de bacterias de ácido láctico y su uso para la protección de productos alimenticios**

30 Prioridad:

19.03.2007 DK 200700418
25.04.2007 EP 07106931

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.09.2017

73 Titular/es:

CHR. HANSEN A/S (100.0%)
Bøge Allé 10-12
2970 Hørsholm, DK

72 Inventor/es:

STAHNKE, LOUISE HELLER;
HORNBAEK, TINA y
JELLE, BIRTHE

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 631 908 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

Una cepa nueva de bacterias de ácido láctico y su uso para la protección de productos alimenticios

[0001] La presente invención se refiere a una bacteria de ácido láctico nueva que produce agentes antimicrobianos (bacteriocinas) sensibles a proteasa a bajas temperaturas de almacenamiento. Particularmente, la presente invención se refiere al *Lactobacillus curvatus* DSM 18775, el cual se ha descubierto que es útil para la bioprotección de productos refrigerados tales como la carne y los productos lácteos listos para el consumo (Ready-To-Eat (RTE)).

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

[0002] Se sabe que la contaminación bacteriana de productos alimenticios es responsable del desperdicio de comida y de la transmisión de enfermedades causadas por alimentos. Este problema es particularmente importante en carnes RTE y productos lácteos que los consumidores no precientan antes de consumir y que se almacenan durante periodos largos de tiempo en frigoríficos entre 2-10 °C. Un caso ejemplar es la *Listeria monocytogenes*, que es una bacteria patógena de especial interés en productos alimenticios tales como los productos cárnicos RTE empaquetados al vacío o en atmósfera modificada, debido a su tolerancia a temperaturas de refrigeración, concentraciones de NaCl relativamente altas y condiciones anaeróbicas o en productos como el queso fresco, debido a la falta de una fase de inactivación térmica. Como resultado, se ha invertido mucho esfuerzo tratando de identificar productos naturales que se puedan añadir de forma segura a los alimentos para inhibir el crecimiento bacteriano.

[0003] Es típico usar bacterias de ácido láctico como cultivos iniciadores para inducir la fermentación de productos cárnicos, normalmente carnes crudas saladas. El término "cultivo iniciador" se refiere a una preparación que contiene células microbianas que pretende inocular una matriz de alimentos que será objeto de fermentación. Los cultivos iniciadores para la fermentación de carne normalmente se componen de una o más bacterias de ácido láctico. El cultivo iniciador pretende producir el cambio deseado en las características de la matriz de alimentos durante la fermentación (p. ej. una acidificación deseada, y otros parámetros sensoriales y tecnológicos determinados). Normalmente, un cultivo iniciador proliferará durante el proceso de fermentación. Durante el proceso de fermentación las bacterias de ácido láctico principalmente producen ácido láctico, por lo cual el pH disminuye hasta el valor deseado de pH dependiendo del cultivo y de las condiciones de procesamiento (temperatura, tipo/contenido de azúcar etc.), y de manera importante, las propiedades sensoriales del producto cambian perceptiblemente.

[0004] Los cultivos antagonistas añadidos a los alimentos para inhibir patógenos y/o alargar el periodo de caducidad sin cambiar las propiedades sensoriales del producto se denominan "cultivos protectores". A diferencia de los cultivos iniciadores, los cultivos protectores no pretenden cambiar las propiedades sensoriales del producto. A su uso o el de sus productos metabólicos (ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, enzimas y bacteriocinas) frecuentemente se le denomina "biopreservación" o "bioprotección" (Castellano, P. y Vignolo, G., "Inhibition of *Listeria* and *Brochothrix thermosphacta* in vacuum-packaged meat by addition of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* CRL705 and its bacteriocins", 2006, Letters in Applied Microbiology. Vol. 43: 194-199). Este estudio demuestra un efecto bacteriostático en una especie no patógena de *Listeria*. No se aprecia efecto bactericida en la *Listeria*. Además la evaluación "sensorial" realizada estaba limitada a las mediciones de pH.

[0005] Además del establecimiento de la bioconservación como un método para asegurar la seguridad microbiológica sin cambiar las características sensoriales del producto, los cultivos bioprotectores también se han evaluado por su potencial para prevenir el crecimiento de bacterias causantes de deterioro (Vermieren, L. et al., "Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products", 2004, International Journal of Food Microbiology, 96: 149-164).

[0006] La aceptabilidad sensorial de productos cárnicos cocinados tratados con cultivos bioprotectores puede limitar el uso del método de conservación, y la capacidad reguladora junto al contenido de glucosa han resultado ser elementos clave para evitar las desviaciones sensoriales cuando se aplican cultivos bioprotectores (Vermieren et Al., supra).

[0007] Frecuentemente se ha observado un rebrote de *Listeria monocytogenes* con el uso de cultivos bioprotectores después de una fase inicial de inhibición. El rebrote se atribuye al desarrollo de la resistencia de *L. monocytogenes* a las bacteriocinas, a la degradación de las moléculas de bacteriocina con proteasas endógenas producidas durante la fase de crecimiento, a la adsorción de las bacteriocinas a la superficie de la cepa productora, o a las interacciones específicas con la matriz alimentaria (Dicks, L.M.T. et al., "Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami", 2004, Meat Science, 66: 703-708).

[0008] La solicitud de patente europea EP 1.475.432 expone dos cepas de *Lactobacillus curvatus*, depositadas como PTA-5150 y PTA-5159 y su uso para reducir el crecimiento de un microbio en una composición alimentaria o farmacéutica.

[0009] La patente n.º US 4.886.673 expone tres cepas de bacterias *Lactobacillus curvatus* DSM 4265, *Micrococcus varians* DSM4263, y *Debaromyces hansenii* DSM 4260 y su uso para conservar productos cárnicos. El ejemplo 1 describe el uso de *Lactobacillus curvatus* DSM 4265 en la producción de embutidos crudos.

[0010] La solicitud de patente europea EP 0.640.291 expone el uso de *Lactobacillus curvatus* DSM 8430 como un cultivo iniciador en la producción de salami. Se menciona específicamente que tiene lugar una producción óptima de bacteriocina a temperaturas entre 15 y 20 °C y que la actividad se reduce a temperaturas bajas (+4 °C).

[0011] Vogel, R.F. et al., (1993, System. Appl. Microbiol., 16: 457-462) expone el uso de la cepa LT 1174 de *Lactobacillus curvatus* como un cultivo iniciador en la producción de salami. Se menciona específicamente que tiene lugar una producción óptima de bacteriocina a temperaturas entre 15 y 20 °C y que la actividad se reduce a temperaturas bajas (+4 °C).

[0012] Benkerroum, N. et al. (2005, J. Appl. Microbiol., 98: 56-63) expone el uso de una cepa LBPE de *Lactobacillus curvatus* como un cultivo iniciador en la producción de salchichas fermentadas deshidratadas. La fermentación se lleva a cabo a 30 °C, y el secado a 14-16 °C. No se demostró ningún efecto bioprotector a temperaturas bajas.

[0013] Mauriello, G. et al. (2004, J. Appl. Microbiol., 97: 314-322) expone el uso de películas de polietileno para empaquetar alimentos las cuales se tratan con bacteriocina parcialmente purificada de la cepa 32Y de *Lactobacillus curvatus*. Para producir la bacteriocina esta cepa concreta se cultiva a 30 °C.

[0014] Mataragas et al. (2003, Food Microbiology, 20: 259-265) expone un *Lactobacillus curvatus* L442 que tiene actividad antimicrobiana contra la *Listeria monocytogenes*. Se han investigado los cambios de pH y los resultados se proveen en la Fig. 3 mostrando una disminución del pH de 6,5 a aproximadamente 5,5 debido a la producción de acetato (Fig. 4). Se sabe que tal descenso del pH reduce la cantidad de microorganismos patógenos por sí mismo. La cantidad de acetato producido es bastante alta y puede producir cambios sensoriales, p.ej. tener un impacto en el sabor.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0015] El problema a resolver mediante la presente invención es el suministro de una cepa bacteriana que inhiba el crecimiento de bacterias patógenas producidas en la carne y causantes de deterioro a temperaturas bajas (2-10 °C) sin cambiar las propiedades sensoriales del producto alimenticio.

[0016] La solución se basa en una cepa de *Lactobacillus curvatus* depositada bajo el número de registro DSM 18775.

[0017] Como se ilustra abajo de manera no restringida, se ha descubierto que la cepa de *Lactobacillus curvatus* depositada bajo el número de registro DSM 18775 es útil para la bioprotección de productos alimenticios. La cepa de *Lactobacillus curvatus* depositada bajo el número de registro DSM 18775 puede ser útil y ha demostrado ser particularmente útil para la inhibición de bacterias patógenas procedentes de los alimentos debido a la producción de bacteriocinas.

[0018] Las bacterias patógenas procedentes de los alimentos y las bacterias causantes de deterioro, pueden ser aeróbicas, anaeróbicas u opcionalmente anaeróbicas, y así, la eliminación de solo oxígeno de un paquete de alimentos o de un ambiente de almacenamiento de alimentos no eliminará eficazmente todos los tipos de bacterias indeseadas. Además, el control de la temperatura en el almacenamiento de alimentos no es totalmente eficaz para excluir el crecimiento de bacterias de este tipo porque pueden crecer varios tipos de bacterias patógenas y bacterias causantes de deterioro a varias temperaturas. En cambio, hay otras bacterias patógenas, que debido a su tolerancia a las temperaturas de refrigeración, a las concentraciones relativamente altas de NaCl y a las condiciones anaeróbicas, son de especial interés en los productos alimenticios RTE.

[0019] Los inventores de la presente invención han observado que bajo condiciones de refrigeración, la cepa de *Lactobacillus curvatus* depositada bajo el número de registro DSM 18775 produce bacteriocinas, lo cual causa reducciones considerables en la cantidad de bacterias patógenas procedentes de los alimentos sin provocar cambios sensoriales indeseados, y también impide el crecimiento de bacterias causantes de deterioro en el producto alimenticio. El hecho de que el *Lactobacillus curvatus* depositado bajo el número de

registro DSM 18775 sea capaz de producir bacteriocinas a una temperatura de refrigeración implica que dicha cepa puede usarse para la bioprotección de productos refrigerados, y particularmente de productos refrigerados listos para comer envasados al vacío o en atmósfera modificada.

[0020] Así, en un aspecto la presente invención se refiere a una cepa de *Lactobacillus curvatus* depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bajo el número de registro DSM 18775 caracterizada por el hecho de que tiene la capacidad de, a una temperatura que varía entre los 2 y los 10 °C, inhibir el crecimiento de al menos una bacteria patógena procedente de los alimentos sin provocar cambios sensoriales en los alimentos.

[0021] Una muestra de cultivo del microorganismos se depositó el 09.11.2006 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bajo el número de registro DSM 18775.

[0022] Un aspecto importante en la evaluación del uso de una cepa como un cultivo bioprotector es la capacidad de la cepa de funcionar en el producto alimenticio para el cual está destinada. En este aspecto no sólo es importante que la cepa sea capaz de inhibir cualquier bacteria patógena indeseada procedente de los alimentos en el producto bajo condiciones de almacenamiento pertinentes, sino también que no produzca ningún efecto sensorial indeseado (pérdida de sabor, pérdida de olor o cambios de color indeseados). La cepa de *Lactobacillus curvatus* depositada bajo el número de registro DSM 18775 inhibe considerablemente las bacterias patógenas procedentes de los alimentos cuando se aplica a una gama amplia de productos cárnicos RTE reales a lo largo del almacenamiento en condiciones de almacenamiento relevantes. Los inventores han demostrado mediante análisis sensoriales que el cultivo de la cepa de *Lactobacillus curvatus* depositada bajo el número de registro DSM 18775 no afecta negativamente a la calidad sensorial de los productos alimenticios (tales como varios productos de carne RTE) bajo condiciones de almacenamiento pertinentes, como se ilustra abajo.

[0023] Además, a diferencia de otras cepas usadas como cultivos bioprotectores, cuando el cultivo de la cepa de *Lactobacillus curvatus* depositada bajo el número de registro DSM 18775 se usa como un cultivo bioprotector, no se aprecia rebrote de *L. monocytogenes*.

[0024] Por lo tanto, cuando se usa un cultivo de una cepa según la presente invención hay riesgos de salud reducidos asociados a la ingestión de productos refrigerados, debido al aumento en la seguridad del producto durante el periodo de caducidad. Consecuentemente, la pérdida económica para la industria alimentaria se puede reducir considerablemente.

[0025] En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para preparar una composición capaz de inhibir el crecimiento de al menos una bacteria patógena procedente de los alimentos, y dicho proceso comprende: (a) cultivar células de una cepa de *Lactobacillus curvatus* según el primer aspecto de la invención, que después del cultivo en un medio de cultivo produce una bacteriocina que produce actividad inhibitoria contra cepas bacterianas, incluida la *Listeria monocytogenes*, para obtener un sobrenadante que comprende la bacteriocina; y (b) separar el sobrenadante de las células cultivadas para obtener el sobrenadante, obteniendo así una composición sobrenadante formada por la bacteriocina.

[0026] En una forma de realización de este aspecto la bacteriocina formada por la composición sobrenadante es posteriormente sometida a una fase de secado para obtener un producto de eluato de cultivo deshidratado. La fase de secado puede convenientemente ser criodesecación o secado por atomización. Como se describe en el ejemplo 8 el proceso resulta en un producto de eluato de cultivo deshidratado que inhibe la *Listeria monocytogenes* en productos de carne empaquetados en atmósfera modificada o al vacío.

[0027] La composición inhibidora del crecimiento tiene un efecto bactericida en al menos una bacteria patógena procedente de los alimentos cuando se proveen cantidades suficientes. Un ejemplo es una composición inhibidora del crecimiento que tiene un efecto bactericida en la *Listeria monocytogenes* cuando se proveen cantidades suficientes. Esto se ilustra en el ejemplo 8 Fig. 7a.

[0028] Una composición de eluato de cultivo puede originarse de los procesos arriba mencionados, p. ej. de la fase (a) del proceso del tercer aspecto de la invención o de la fase (b) del proceso del tercer aspecto de la invención.

[0029] En otro aspecto, la presente invención se refiere a composiciones para la conservación de productos alimenticios que se componen de la cepa de *Lactobacillus curvatus* según el primer aspecto de la invención.

[0030] En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una cepa de *Lactobacillus curvatus* según el primer aspecto de la invención o a la composición de sobrenadante de la fase b) del proceso según el tercer aspecto de la invención para la conservación de productos alimenticios.

[0031] Además, la presente invención se refiere al uso de una cepa de *Lactobacillus curvatus* según el primer aspecto de la invención o a la composición sobrenadante de la fase b) del proceso según el tercer aspecto de la invención para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas procedentes de los alimentos o bacterias causantes de deterioro en productos alimenticios que se conservan en un estado refrigerado a una temperatura que varía entre los 2 y los 10 °C.

[0032] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para controlar la contaminación por *Listeria* en un producto alimenticio, en equipamiento de procesamiento de alimentos, o en contenedores de almacenaje de alimentos, el cual comprende la aplicación de la cepa de *Lactobacillus curvatus* con el número de registro DSM 18775, **caracterizada por el hecho de que** tiene la capacidad, a una temperatura que varía entre los 2 y los 10 °C, de inhibir el crecimiento de al menos una bacteria patógena procedente de los alimentos sin provocar cambios sensoriales en los alimentos, en un producto alimenticio o en equipamiento de procesamiento de alimentos en una cantidad suficiente como para reducir la cantidad o evitar el crecimiento de *Listeria*.

[0033] A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y las variaciones de la palabra, tales como "que comprende", no pretenden excluir otras características de técnicas, aditivos, componentes, o fases. Otros objetos, ventajas y características adicionales de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica tras examinar la descripción o se podrán apreciar al poner en práctica la invención. Los ejemplos y dibujos siguientes se proveen como ilustración, y no pretenden limitar la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0034]

La FIG. 1 representa el recuento de células de *L. monocytogenes* en lonchas de mortadela inoculadas con (■) o no inoculadas con (♦) DSM 18775 (nivel inicial de 10^7 CFU/g). Las lonchas de mortadela se empaquetaron en atmósfera modificada (30 % CO₂ y 70 % N₂) y se almacenaron a 7 °C. El recuento de células se basó en las determinaciones tomadas respecto a dos lonchas diferentes de carne, y las barras indican las desviaciones estándar entre estos valores duplicados.

La FIG. 2 representa el recuento de células de *L. monocytogenes* en lonchas de mortadela hechas de carne finamente troceada inoculada con (■) o no inoculada con (♦) DSM 18775 (nivel inicial de 10^7 CFU/g). Las lonchas de mortadela se empaquetaron en atmósfera modificada (30 % CO₂ y 70 % N₂) y se almacenaron a 7 °C. El recuento de células se basó en las determinaciones tomadas respecto a dos lonchas diferentes de carne, y las barras indican las desviaciones estándar entre estos valores duplicados.

La FIG. 3 representa el recuento de células de *L. monocytogenes* en lonchas de jamón cocido ahumado, inoculado con (■) o no inoculado con (♦) DSM 18775 (nivel inicial de 10^7 CFU/g). Las lonchas de jamón se empaquetaron en atmósfera modificada (30 % CO₂ y 70 % N₂) y se almacenaron a 7 °C. El recuento de células se basó en las determinaciones tomadas respecto a dos lonchas diferentes de carne, y las barras indican las desviaciones estándar entre estos valores duplicados.

La FIG. 4 representa el recuento de células de *L. monocytogenes* en salchichas vienasas, inoculadas con (■) o no inoculadas con (♦) DSM 18775 (nivel inicial de 10^7 CFU/g). Las salchichas vienasas se envasaron al vacío y se almacenaron a 7 °C. El recuento de células se basó en las determinaciones tomadas respecto a dos salchichas diferentes, y las barras indican las desviaciones estándar entre estos valores duplicados.

La FIG. 5 representa el recuento de células de *L. monocytogenes* en lonchas de jamón cocido, inoculado con (■) o no inoculado con (♦) DSM 18775 (nivel inicial de 10^7 CFU/g). Las lonchas de jamón se empaquetaron en atmósfera modificada (30 % CO₂ y 70 % N₂) y se almacenaron a 5 °C. El recuento de células se basó en las determinaciones tomadas respecto a dos lonchas diferentes de jamón cocido, y las barras indican las desviaciones estándar entre estos valores duplicados.

La FIG. 6 representa el desarrollo en pH en quesos inoculados con DSM 18775 (■) o no inoculados con DSM 18775 (♦) (nivel inicial de 10^7 CFU/g). Los quesos se empaquetaron al vacío y se almacenaron a 9 °C. El pH se mide en una suspensión de queso y agua (1:1) agitada durante 30 min antes de la medición de pH (usando un pH-metro, radiómetro PHM 92, Copenhagen, DK).

La FIG. 7. Recuento de células de *L. monocytogenes* expuestas a eluato de cultivo de DSM18775 o MicroGARD 730 en concentraciones diferentes, tal y como se explica en las cifras de la leyenda de la

derecha, en lonchas de salchicha emulsionada almacenadas en atmósfera modificada (atmósfera modificada, 30 % CO₂ y 70 % N₂) 7a, o al vacío (7b) a 7 °C. El recuento de células se basó en las determinaciones tomadas respecto a dos lonchas diferentes de carne, y las barras indican las desviaciones estándar entre estos valores duplicados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE FORMAS DE REALIZACIÓN PARTICULARES

[0035] La cepa de *Lactobacillus curvatus* DSM 18775 de la presente invención es una bacteria de ácido láctico. Se aisló de alimentos fermentados y se identificó como *Lactobacillus curvatus* mediante la electroforesis en gel de proteínas seguida del análisis y la reagrupación con los perfiles de referencia de la base de datos de recogida de cultivos del LMG. Además, usando una caracterización de perfil API, el DSM 18775 se identificó como *Lactobacillus curvatus* con una probabilidad de un 63,4 %. La cepa se caracterizó por la metabolización completa de: D-Ribosa, D-Galactosa, D-Glucosa, D-Fructosa, D-Manosa, N-Acetilglucosamina, Esculina, D-Maltosa y D-Trehalosa y por la metabolización parcial de D-Sacarosa después de una incubación de 48 h a 30 °C. La cepa se depositó el 9 de noviembre de 2006 según las condiciones del tratado de Budapest en la 'Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen' GmbH (DSMZ). Se le asignó el número de depósito DSM 18775. La bacteriocina antilisterial producida por el DSM 18775 fue determinada en un ensayo de agar por difusión en pocillo usando *Lactobacillus sakei* NCFB 2714 como el organismo indicador.

[0036] El objetivo de la presente invención también comprende una cepa de *Lactobacillus curvatus* obtenida mediante la mutación de la cepa de *Lactobacillus curvatus* DMS 18775, a condición de que la cepa resultante tenga la capacidad, a una temperatura que varía entre los 2 y los 10 °C, de inhibir el crecimiento de al menos una bacteria patógena procedente de los alimentos sin provocar cambios sensoriales en los alimentos.

[0037] En el proceso para preparar la bacteriocina, la cepa de la presente invención que produce la bacteriocina, se cultiva en un medio y bajo condiciones que son favorables al crecimiento, el sobrenadante se aísla del cultivo resultante separando el sobrenadante de las células cultivadas para obtener un sobrenadante que contiene la bacteriocina, y para llevar a cabo la separación, el cultivo resultante se centrifuga y se obtiene un extracto sobrenadante que contiene la bacteriocina. El sobrenadante se puede concentrar para obtener un concentrado que comprende la bacteriocina, y se puede obtener una bacteriocina aislada y purificada del sobrenadante concentrado que se puede deshidratar.

[0038] En una forma de realización preferida particular de este proceso la composición sobrenadante es posteriormente sometida a una fase de secado para obtener un eluato de cultivo deshidratado. La fase de secado puede convenientemente ser criodesecación o secado por atomización, pero se contempla cualquier proceso de secado que sea conveniente para el secado de bacteriocinas, incluidos el secado al vacío y el secado mediante aire. Aunque la bacteriocina producida a temperaturas bajas por *Lactobacillus curvatus* DSM 18775 no está aún caracterizada en cuanto a los detalles, se sabe que algunos *Lactobacillus curvatus* pueden producir bacteriocinas de la clase IIa, incluida la Sakacina. Las bacteriocinas la clase IIa son pequeñas proteínas termoestables, por lo que esperamos que incluso los métodos de secado, que suponen un calentamiento moderado del eluato de cultivo, resultarán en composiciones activas.

[0039] La bacteriocina según la presente invención se caracteriza en más detalle abajo con la ayuda de varios descubrimientos microbiológicos, bioquímicos y genéticos que ilustran sus propiedades. Los porcentajes se dan por peso. La unidad de actividad antibacteriana es acorde a la "prueba de agar en pocillo". Dentro del contexto de la presente exposición, la actividad inhibitoria se define en cuanto a unidades arbitrarias.

[0040] La prueba de agar en pocillo se utiliza para determinar si el sobrenadante del cultivo que contiene la bacteriocina según la presente invención muestra actividad inhibitoria contra diferentes cepas de esporas y bacterias. Se determina así el espectro de inhibición del sobrenadante.

[0041] El término "producto alimenticio" tal y como se utiliza en este documento se refiere a cualquier alimento que se pueda deteriorar como resultado del crecimiento bacteriano y la proliferación. Dichos productos alimenticios incluyen, pero no se limitan a, carne, productos lácteos, verduras, frutas y cereales.

[0042] Los términos "producto refrigerado" o "conservado en estado refrigerado" se usan de la misma forma y se refieren a productos alimenticios que se almacenan a temperaturas que varían entre los 2 y los 10 °C. El producto alimenticio puede envasarse tanto al vacío como en atmósfera modificada.

[0043] Tal y como se utiliza en este documento, el término "carne" se refiere a cualquier producto de carne o subproducto de carne (incluidos los procesados) de un animal consumido por seres humanos o animales, incluyendo, sin limitarse a, carne de especies bovinas, ovinas y porcinas, aves, pescados y crustáceos. Tal y como se usa en la presente solicitud, el término "producto cárnico listo para comer", al que también se hace

referencia como producto cárnico RTE, pretende incluir cualquier producto cárnico que no requiera que se cocine antes de consumirlo.

[0044] El término "producto lácteo" pretende incluir cualquier producto alimenticio hecho con leche o productos lácteos, incluyendo, pero sin limitarse a, leche, yogur, helado, queso, mantequilla y nata.

[0045] Tal y como se utiliza en este documento, el término "periodo de caducidad" se refiere al periodo de tiempo en que un producto alimenticio es comerciable para los clientes de comercio al por menor. En el procesamiento tradicional de carne, el periodo de caducidad de la carne y subproductos cárnicos es de aproximadamente 30 a 40 días después de haber matado al animal. Se supone que la refrigeración de la carne durante este periodo de tiempo detiene y/o retrasa en gran medida el crecimiento de bacterias patógenas, y en menor medida, las bacterias causantes de deterioro. Después de aproximadamente 30 a 40 días, no obstante, la refrigeración ya no es capaz de controlar eficazmente la proliferación de bacterias causantes de deterioro por debajo de niveles aceptables.

[0046] El término "efecto bactericida", tal y como se utiliza en este documento, se refiere a cualquier tipo de tratamiento que mata bacterias (es decir, que reduce la cantidad). Esto contrasta con el "efecto bacteriostático" que hace referencia a la situación en la que el tratamiento sólo inhibe el crecimiento o la reproducción de las bacterias. Se dice que un agente es un bactericida o un bacteriocida si el agente es capaz de matar uno o más tipos de bacterias. Se dice que un bactericida posee actividad bactericida o bacteriocida.

[0047] Por "bacteriocinas" nos referimos a péptidos o moléculas de proteína liberadas extracelularmente que son capaces de matar otras bacterias determinadas muy relacionadas mediante un mecanismo por el que la célula productora muestra cierto grado de inmunidad específica.

[0048] El término "bacterias causantes de deterioro", tal y como se utiliza en este documento, se refiere a cualquier tipo de bacterias que causa el deterioro de los alimentos. Las bacterias causantes de deterioro pueden crecer y proliferar hasta tal punto que un producto alimenticio resulte inadecuado o indeseado para el consumo humano o animal. Las bacterias son capaces de proliferar en superficies de alimentos, como en superficies de carne, asimilando los azúcares y proteínas en tales superficies. Para metabolizar estos componentes, las bacterias causantes de deterioro crean subproductos como dióxido de carbono, metano, compuestos de nitrógeno, ácido butírico, ácido propiónico, ácido láctico, ácido fórmico, compuestos de azufre, y otros gases y ácidos indeseados. La producción de subproductos de este tipo altera el color de las superficies de la carne, frecuentemente haciendo que la carne pase de un color rojo a un color marrón, gris o verde. Los subproductos gaseosos generados por las bacterias causantes de deterioro le dan también a la carne deteriorada un olor indeseable. Las alteraciones en el color y el olor de la carne debido al crecimiento de bacterias causantes de deterioro en la superficie de un producto cárnico frecuentemente hace que los consumidores no puedan comprar dicho producto alimenticio.

[0049] Además del control de las bacterias causantes de deterioro, otro aspecto importante en la industria del procesamiento de alimentos es el control del crecimiento de bacterias patógenas procedentes de los alimentos. Tal y como se utiliza en este documento, el término "bacterias patógenas procedentes de los alimentos" se refiere a cualquier organismo de intoxicación alimentaria que sea capaz de provocar una dolencia o enfermedad en animales o seres humanos. El término "bacterias patógenas procedentes de los alimentos" debe considerarse que incluye bacterias que infectan el producto alimenticio (la carne, por ejemplo) y de ese modo causa una dolencia o una enfermedad, al igual que las bacterias que producen toxinas que causan dolencias o enfermedades. Preferiblemente, la bacteria patógena procedente de los alimentos se selecciona del grupo: *Aeromonas caviae*; *Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas sobria*; *Bacillus cereus*; *Campilobacter jejuni*; *Citrobacter* ssp.; *Clostridium botulinum*; *Clostridium perfringens*; *Enterobacter* ssp.; *Enterococcus* ssp.; cepas de *Escherichia coli* enteroinvasora; cepas de *Escherichia coli* enteropatógena; cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica; *Escherichia coli* O157:H7. *Klebsiella* ssp.; *Listeria monocytogenes*; *Plesiomonas shigelloides*; *Salmonella* ssp.; *Shigella* ssp.; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus* ssp.; *Vibrio cholerae*; *Yersinia enterocolitica*. Más preferiblemente, las bacterias patógenas son *Listeria monocytogenes*.

[0050] Tal y como se utiliza en este documento, la expresión "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de bacterias de *Lactobacillus curvatus* según el primer aspecto de la invención que da lugar a una inhibición del crecimiento bacteriano o a una reducción de la cantidad de otras bacterias del producto alimenticio.

[0051] Abajo se ofrecen aspectos y formas de realización preferidos de la invención.

[0052] Una cepa de *Lactobacillus curvatus* depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bajo el número de registro DSM 18775 caracterizada por el hecho de que tiene la capacidad, a una temperatura que varía entre los 2 y los 10 °C, de inhibir el crecimiento de al menos una bacteria patógena procedente de los alimentos sin provocar cambios sensoriales en los alimentos.

[0053] Una composición para conservar un producto alimenticio caracterizada por el hecho de que comprende una cepa de *Lactobacillus curvatus* según la invención.

5 [0054] La composición según la invención, donde la composición retrasa el desarrollo de bacterias patógenas procedentes de los alimentos o las bacterias causantes de deterioro.

[0055] La composición según la invención, donde el producto alimenticio es carne lista para el consumo Ready-To-Eat (RTE) o un producto lácteo.

10 [0056] Un proceso para preparar una composición capaz de inhibir el crecimiento de al menos una bacteria patógena procedente de los alimentos y dicho proceso comprende:

15 (a) cultivar células de una cepa de *Lactobacillus curvatus* de la invención, que tras su cultivo en un medio de cultivo produce una bacteriocina que tiene actividad inhibidora contra las cepas bacterianas incluida la *Listeria monocytogenes* para obtener un sobrenadante que comprende la bacteriocina; y
(b) separar el sobrenadante de las células cultivadas para obtener el sobrenadante, obteniendo así una composición sobrenadante que comprende la bacteriocina.

20 [0057] El proceso puede además comprender aislar la bacteriocina de la composición sobrenadante para obtener un producto de bacteriocina purificada.

[0058] El proceso puede además comprender concentrar la composición sobrenadante para obtener un concentrado que comprende la bacteriocina.

25 [0059] Uso de una cepa de *Lactobacillus curvatus* según la invención o la composición sobrenadante de la fase (b) del proceso según la invención para conservar productos alimenticios.

30 [0060] Uso de una cepa de *Lactobacillus curvatus* según la invención o la composición sobrenadante de la fase (b) del proceso según la invención para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas procedentes de los alimentos o las bacterias causantes de deterioro en productos alimenticios conservados en estado refrigerado a una temperatura que varía entre los 2 y los 10 °C.

35 [0061] Las cepas y cultivos de *Lactobacillus curvatus* o el sobrenadante pueden ser útiles para retrasar la aparición de efectos sensoriales indeseados (pérdida de sabor, pérdida de olor o cambios de color indeseados) en productos alimenticios conservados en estado refrigerado.

[0062] El producto alimenticio puede envasarse al vacío o en atmósfera modificada. El producto alimenticio puede ser un producto cárnico RTE o un producto lácteo.

40 [0063] La bacteria patógena procedente de los alimentos puede ser *Listeria monocytogenes*.

[0064] Un proceso de conservación de productos alimenticios puede ser caracterizado por el hecho de que el *Lactobacillus curvatus* según la invención o la composición sobrenadante de la fase (b) del proceso según la invención se añade en una cantidad eficaz para dichos productos alimenticios.

[0065] La cepa de *Lactobacillus curvatus* o la composición sobrenadante se puede añadir durante el proceso de producción del producto alimenticio o al producto alimenticio para formar una barrera en la superficie de dicho producto.

50 [0066] El producto alimenticio puede ser una carne RTE o un producto lácteo.

[0067] Un método para controlar la contaminación de *Listeria* en un producto alimenticio, en un equipamiento para el procesamiento de alimentos, o en contenedores de almacenaje de alimentos, que comprende aplicar la cepa de *Lactobacillus* con el número de registro DSM 18775 caracterizada por el hecho de que tiene la capacidad, a una temperatura que varía entre los 2 y los 10 °C, de inhibir del crecimiento de al menos una bacteria patógena procedente de los alimentos sin provocar cambios sensoriales en los alimentos, en un producto alimenticio o en un equipamiento para el procesamiento de alimentos en una cantidad suficiente para reducir la cantidad de *Listeria*.

60 EJEMPLOS

Ejemplo 1. Identificación de la cepa y producción de bacteriocina

65 [0068] Después del crecimiento del DSM 18775 en caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe, Difco, VWR, Herlev, Dinamarca) durante 22 h a 25 °C, la suspensión celular se centrifugó a 4.000 x g durante 15 min. El

sobrenadante se ajustó a pH 6,0 $\pm$ 0,1 con 1 N NaOH y se esterilizó mediante filtro (0,45 μ m). Se hicieron diluciones dobles del sobrenadante en agua estéril de intercambio iónico y se añadieron 50 μ l de cada dilución de bacteriocina a pocillos en Agar MRS que contiene el organismo indicador, *Lactobacillus sakei* NCFB 2714, en una concentración de 10⁶ CFU/ml. Para verificar la naturaleza proteínica de las sustancias inhibidoras, una solución de la enzima proteolítica, proteinasa K, se aplicó junto a un pocillo del ensayo de agar por difusión en pocillo. La actividad de bacteriocina del sobrenadante celular se definió como el recíproco de la dilución máxima que provoca una zona de inhibición en el ensayo de agar. En las zonas de inhibición causadas por un compuesto proteínico, la bacteriocina, se observó una actividad de 500 unidades/ml de sobrenadante celular, que indica claramente la capacidad del DSM 18775 de producir cantidades considerables de bacteriocina antilisterial.

Ejemplo 2. Prueba de aplicación con *Lactobacillus curvatus* DSM 18775 en embutido de mortadela a lonchas (I)

[0069] El efecto antilisterial del DSM 18775 y el impacto sensorial del cultivo se evaluó en embutido de mortadela a lonchas. Se añadió un cóctel de 5 cepas de *L. monocytogenes* a la superficie del producto cárnico RTE (10³ CFU/g) y a continuación se inoculó el cultivo bioprotector (10⁷ CFU/g). El producto se empaquetó en atmósfera modificada (30 % CO₂ y 70 % N₂) y se almacenó a 7 °C durante 27 días.

[0070] El recuento de células del cultivo bioprotector se determinó colocando en placas diluciones apropiadas hechas 10 veces en solución salina de peptona sobre placas de agar MRS e incubándolas anaeróbicamente durante 3 días a 30 °C. El DSM 18775 proliferó en el producto y alcanzó aprox. 10⁸ CFU/g después de 1 semana de almacenamiento y aprox. 10⁹ CFU/g al final del almacenamiento. El recuento de células de *Listeria* se determinó colocando en placas diluciones apropiadas hechas 10 veces en solución salina de peptona sobre placas de agar PALCAM seleccionador de *Listeria* (Oxoid A/S, Glostrup, Dinamarca) e incubando microaerófilos durante 48 h a 37 °C. Este recuento de células se puede ver en la Fig. 1, y muestra un efecto bactericida del DSM 18775 en *L. monocytogenes*.

[0071] Las pruebas sensoriales descriptivas de triángulo realizadas por un jurado de 10 jueces no mostraron ningún efecto significativo de añadir el cultivo bioprotector tras 11 días de almacenamiento. Después de 21 días de almacenamiento (fin del periodo de caducidad), los productos con cultivo bioprotector añadido se percibieron como más frescos en cuanto al sabor y al olor en comparación con los productos sin el DSM 18775 añadido, que fueron caracterizados como más insípidos.

Ejemplo 3. Prueba de aplicación con *Lactobacillus curvatus* DSM 18775 en embutidos de mortadela a lonchas (II), troceada muy finamente

[0072] El efecto antilisterial del DSM 18775 y el impacto sensorial del cultivo se evaluó en embutido de mortadela a lonchas hecho de carne troceada muy finamente. Se añadió un cóctel de 5 cepas de *L. monocytogenes* a la superficie del producto cárnico RTE (10³ CFU/g) y a continuación se inoculó el cultivo bioprotector (10⁷ CFU/g). El producto se empaquetó en atmósfera modificada (30 % CO₂ y 70% N₂) y se almacenó a 7 °C durante 27 días.

[0073] El recuento de células del cultivo bioprotector se determinó poniendo diluciones apropiadas base 10 hechas en solución salina de peptona sobre placas de agar MRS e incubándolas anaeróbicamente durante 3 días a 30 °C. El DSM 18775 proliferó en el producto y alcanzó aprox. 10⁸ CFU/g después de 1 semana de almacenamiento y aprox. 10⁹ CFU/g al final del almacenamiento.

[0074] El recuento de células de *Listeria* se determinó poniendo diluciones apropiadas base 10 hechas en solución salina de peptona sobre placas de agar PALCAM seleccionador de *Listeria* (Oxoid A/S, Glostrup, Dinamarca) e incubando microaerófilos durante 48 h a 37 °C. El recuento de células de *Listeria* se puede ver en la Fig. 2, y muestran claramente un efecto bactericida del DSM 18775 en *L. monocytogenes* durante los 27 días de almacenamiento.

[0075] Las pruebas sensoriales descriptivas de triángulo realizadas por un jurado de 10 jueces no mostraron ningún efecto significativo por añadir el cultivo bioprotector tras 11 días de almacenamiento o al final del periodo de caducidad, es decir después de 21 días de almacenamiento.

Ejemplo 4. Prueba de aplicación con *Lactobacillus curvatus* DSM 18775 en jamón cocido ahumado en lonchas

[0076] El efecto antilisterial del DSM 18775 y el impacto sensorial del cultivo se evaluó en jamón cocido ahumado en lonchas. Se añadió un cóctel de 5 cepas de *L. monocytogenes* a la superficie del producto cárnico RTE (10³ CFU/g) y a continuación se inoculó el cultivo bioprotector (10⁷ CFU/g). El producto se empaquetó en atmósfera modificada (30 % CO₂ y 70 % N₂) y se almacenó a 7 °C durante 27 días.

[0077] El recuento de células del cultivo bioprotector se determinó colocando en placas diluciones apropiadas hechas 10 veces en solución salina de peptona sobre placas de agar MRS e incubándolas anaeróticamente durante 3 días a 30 °C. El DSM 18775 proliferó en el producto y alcanzó aprox. 10^8 CFU/g después de 1 semana de almacenamiento y aprox. 10^9 CFU/g al final del almacenamiento.

[0078] El recuento de células de *Listeria* se determinó poniendo diluciones apropiadas base 10 hechas en solución salina de peptona sobre placas de agar PALCAM seleccionador de *Listeria* e incubando microaerófilos durante 48 h a 37 °C. Este producto no fue compatible con el crecimiento de *L. monocytogenes* (probablemente debido a la fase de ahumado), pero se observaron reducciones mayores en el recuento de células de *L. monocytogenes* durante los 27 días de almacenamiento en presencia de DSM 18775, en comparación con su ausencia (Fig. 3).

[0079] Las pruebas sensoriales descriptivas de triángulo realizadas por un jurado de 10 jueces no mostraron ningún efecto significativo de añadir el cultivo bioprotector tras 11 días de almacenamiento o al final del periodo de caducidad, es decir después de 21 días de almacenamiento.

Ejemplo 5. Prueba de aplicación con *Lactobacillus curvatus* DSM 18775 en salchichas vienesas

[0080] El efecto antilisterial del DSM 18775 y el impacto sensorial del cultivo se evaluó en salchichas vienesas. Se añadió un cóctel de 5 cepas de *L. monocytogenes* a la superficie del producto cárnico RTE (10^3 CFU/g) y a continuación se inoculó el cultivo bioprotector (10^7 CFU/g). Las salchichas se empaquetaron al vacío y se almacenaron a 7 °C durante 27 días.

[0081] El recuento de células del cultivo bioprotector se determinó colocando en placas diluciones apropiadas hechas 10 veces en solución salina de peptona sobre placas de agar MRS e incubándolas anaeróticamente durante 3 días a 30 °C. El DSM 18775 proliferó en el producto y alcanzó aprox. 10^8 CFU/g después de 1 semana de almacenamiento y aprox. 5×10^8 CFU/g al final del almacenamiento.

[0082] El recuento de células de *Listeria* se determinó colocando en placas diluciones apropiadas hechas 10 veces en solución salina de peptona sobre placas de agar PALCAM selectivas de *Listeria* e incubando microaerófilos durante 48 h a 37 °C. Se descubrió un efecto bactericida instantáneo del DSM 18775 en *L. monocytogenes* y el recuento de células reducido fue constante a lo largo de todo el almacenamiento a diferencia del crecimiento pronunciado de *L. monocytogenes* descubierto en ausencia del cultivo bioprotector en este producto cárnico RTE (Fig. 4).

[0083] Se usó un ensayo de agar por difusión en pocillo para detectar bacteriocinas producidas por el DSM 18775 en las salchichas vienesas usando *Lactobacillus sakei* como organismo indicador. Se extrajo bacteriocina de las salchichas homogenizando con 0,02M HCl (1:2, p/v), centrifugando a $16.000 \times g$ durante 5 min a 5 °C, ajustando el sobrenadante a pH $6,0 \pm 0,1$ con 1 N NaOH y esterilizando mediante filtro (0,45 µm). Para verificar la naturaleza proteínica de las sustancias inhibidoras, se aplicó una solución de la enzima proteolítica, proteinasa K, junto al extracto de la salchicha en el ensayo de agar por difusión en pocillo. Se observaron zonas de inhibición provocadas por un compuesto proteínico, supuestamente bacteriocina, de extractos derivados de las salchichas vienesas después de 11, 21 y 28 días de almacenamiento. En las pruebas sensoriales descriptivas de triángulo realizadas por un jurado de 10 jueces, las salchichas vienesas con DSM 18775 añadido se consideraron ligeramente diferentes y más frescas, que las salchichas sin cultivo bioprotector después de 11 días de almacenamiento, mientras que no se detectó ningún efecto significativo en la calidad sensorial por añadir el DSM 18775 después de 21 días de almacenamiento, es decir al final del periodo de caducidad.

Ejemplo 6. Prueba de aplicación con *Lactobacillus curvatus* DSM 18775 en jamón cocido en lonchas

[0084] El efecto antilisterial del DSM 18775 y el impacto sensorial del cultivo se evaluó en jamón cocido en lonchas. Se añadió un cóctel de 5 cepas de *L. monocytogenes* a la superficie del producto cárnico RTE (10^3 CFU/g) con y sin la inoculación concomitante del cultivo bioprotector (10^7 CFU/g). El producto se empaquetó en una atmósfera modificada (30 % CO₂ y 70 % N₂) y se almacenó a 5 °C durante 4 semanas.

[0085] El recuento de células del cultivo bioprotector se determinó colocando en placas diluciones apropiadas hechas 10 veces en solución salina de peptona sobre placas de agar MRS e incubándolas anaeróticamente durante 3 días a 30 °C. El DSM 18775 proliferó en el producto y alcanzó aprox. 10^8 CFU/g al final del almacenamiento.

[0086] El recuento de células de *Listeria* se determinó colocando en placas diluciones apropiadas hechas 10 veces en solución salina de peptona sobre placas de agar PALCAM selectivas de *Listeria* e incubando microaerófilos durante 48 h a 37 °C. Se descubrió un efecto bactericida claro del DSM 18775 en *L. monocytogenes* como se ha visto en la figura 6 con reducciones 1-2 log₁₀ unidades observadas durante todo el almacenamiento (FIG. 5).

[0087] En las pruebas sensoriales descriptivas de triángulo realizadas por un jurado de 8 jueces, no se encontraron diferencias significativas en la calidad sensorial de los productos en presencia del cultivo bioprotector en comparación con su ausencia durante todo el periodo de almacenamiento.

Ejemplo 7. Prueba de aplicación con *Lactobacillus curvatus* DSM 18775 en queso fresco

[0088] A 20 kg leche entera (pasteurizada a 72-73 °C, homogenizada y estandarizada a 3,0 % de grasa láctea) se le añadieron $3,5 \times 10^{10}$ CFU del cultivo bioprotector DSM 18775, correspondiente a aprox. 10^7 CFU/g de queso. En el momento de la inoculación la temperatura de la leche era de 35 °C. El DSM 18775 se premaduró en la leche durante 30 min a 35 °C antes de añadir el cuajo. La producción del queso fresco siguió un protocolo estándar para queso fresco: cortar la cuajada, calentar la cuajada a 43 °C durante 30 min, escurrir el 50 % del suero de leche, salar en seco para obtener un contenido de sal final de un 2 % en el queso. Después de la producción, el queso se dividió en pedazos más pequeños, se empaquetó al vacío por separado y se almacenó durante 4 semanas a 9 °C.

[0089] El recuento de células del cultivo bioprotector se determinó colocando en placas diluciones apropiadas hechas 10 veces en solución salina de peptona sobre placas de agar MRS e incubándolas anaeróticamente durante 3 días a 30 °C. El recuento de células inicial de DSM 18775 fue 10 veces inferior al previsto (aprox. 10^6 CFU/g de queso), pero durante el almacenamiento, el DSM 18775 proliferó en el queso y alcanzó aprox. 10^8 CFU/g después de 4 semanas.

[0090] Durante todo el almacenamiento, se observó una reducción más rápida de pH en el queso con el cultivo bioprotector añadido, pero al final del almacenamiento no se observó ninguna diferencia significativa en el queso con o sin el cultivo bioprotector como se ve en la FIG. 6.

[0091] Un jurado experto de tres evaluadores evaluaron el impacto sensorial de añadir el cultivo bioprotector al queso fresco. Los quesos se calificaron principalmente sobre el sabor y la textura. La valoración se hizo a 10 °C. Los evaluadores describieron el queso con el DSM 18775 añadido como más fresco, más intenso, con una textura mejorada, en comparación con el queso sin el DSM 18775, que se calificó como neutro, sin sabor y con tendencia a desmenuzarse.

[0092] Las bacteriocinas producidas por el DSM 18775 en el queso fresco durante el almacenamiento se determinaron en ensayo de agar por difusión en pocillo usando *Lactobacillus sakei* NCFB 2714 como organismo indicador. Se extrajo bacteriocina del queso para homogenizar con 0,02M HCl (1:5, p/v), centrifugando a 16.000 x g durante 5 min a 5 °C, ajustando el sobrenadante a pH 4,5 ± 0,1 con 1 N NaOH y esterilizando el filtro (0,45 µm). Para verificar la naturaleza proteínica de las sustancias inhibitorias, se aplicó una solución de la enzima proteolítica, proteinasa K, junto al extracto de queso en el ensayo de agar por difusión en pocillo.

[0093] La bacteriocina se produjo y se detectó en el queso fresco durante el almacenamiento en cantidades en aumento durante las primeras 3 semanas (tabla 1) y en una gama de concentración que debía inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en el queso.

Tabla 1.

Día de análisis durante el almacenamiento	Actividad de la bacteriocina en queso con DSM 18775 añadido (unidad/mg)	Actividad de bacteriocina en queso sin DSM 18775 añadido (unidad/mg)
0	-	-
7	8	-
14	16	-
21	32	-
28	32	-

Ejemplo 8. Comparación del eluato de cultivo de *Lactobacillus curvatus* DSM18775 con un eluato de cultivo disponible en el mercado.

[0094] El efecto antilisterial del eluato liofilizado del DSM 18775 se comparó con el efecto de un tipo de producto similar de Danisco, MicroGARD 730, en salchichas emulsionadas a lonchas.

[0095] Se añadió un cóctel de 5 cepas de *L. monocytogenes* en concentraciones finales de aprox. 5×10^3 CFU/g a lonchas de salchichas emulsionadas. Se añadieron soluciones de eluatos de cultivo de DSM18775

y MicroGARD 730 disueltas en agua Milli-Q y esterilizadas mediante filtro (0,2 mm) en concentraciones finales de 0,01 y 0,1 % (p/p). Como forma de control, se añadió el mismo volumen de solución salina de peptona en vez de eluato de cultivo a las lonchas de salchicha emulsionada. Las lonchas de salchichas emulsionadas inoculadas se empaquetaron en atmósfera modificada (atmósfera modificada 30 % CO₂ + 70 % N₂) o al vacío y se almacenaron a 7 °C.

[0096] Después de 1 y 7 días de almacenamiento, la carne envasada en atmósfera modificada y al vacío se examinó para comprobar el contenido de *Listeria* colocando en placas diluciones apropiadas hechas 10 veces en solución salina de peptona sobre placas de agar MRS e incubándolas anaeróticamente durante 2 días a 30 °C. Las lonchas sin *Listeria* añadida se evaluaron sensorialmente después de 1 y 7 días de almacenamiento.

[0097] Los resultados del recuento de células se presentan en la figura 7 y muestran una capacidad superior del eluato de DSM 18775 de inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* bajo ambas condiciones de empaquetado. El MicroGARD 730 sólo tiene un ligero efecto inhibitorio del crecimiento con la concentración máxima (0,1 %) y bajo condiciones de atmósfera modificada. El eluato de cultivo de DSM 18775, al contrario, fue capaz de evitar el crecimiento de *Listeria monocytogenes* con una concentración alta de 0,1 % en el empaquetado de atmósfera modificada y casi evitó el crecimiento en el empaquetado al vacío.

[0098] Las evaluaciones sensoriales no mostraron ningún efecto ni del DSM 18775 ni del MicroGARD en el color o el sabor de las salchichas emulsionadas cuando se empaquetan en atmósfera modificada o al vacío. No obstante, el jurado encargado de las evaluaciones sensoriales percibió un olor ligeramente ácido en las lonchas de salchicha emulsionada envasada al vacío con MicroGARD 730 añadido.

Respecto a los Organismos Microbianos Depositados [SOLUCIÓN EXPERTA, Norma 13 bis.6 (PCT)]

[0099] Para todos los organismos microbianos mencionados en la presente solicitud de patente se aplica lo siguiente.

[0100] Tal y como contemplan las respectivas Oficinas de Patentes de los respectivos estados designados, los solicitantes piden que sólo se haga disponible una muestra de los microorganismos depositados declarados anteriormente a un experto nominado por el solicitante hasta la fecha en que se conceda la patente o la fecha en que se deniegue, se retire o se considere que ha de ser retirada.

[0101] En particular se solicita, que según:

EUROPA

[0102] Con respecto a aquellas designaciones en las que se solicita una Patente Europea, se hará disponible una muestra del microorganismo depositado hasta la publicación de la mención de la concesión de la Patente Europea o hasta la fecha en que la solicitud se haya denegado o retirado o se considere que haya de ser retirada, sólo entregando tal muestra a un experto nominado por la persona que solicita la muestra, y aprobado bien I) por el solicitante y/o II) por la Oficina Europea de Patentes, lo que sea de aplicación (norma 32 CPE).

CANADÁ

[0103] El solicitante pide que, hasta que bien se haya expedido una Patente Canadiense basándose en una solicitud o la solicitud haya sido denegada, o abandonada y sin ser objeto de restablecimiento, o retirada, el Comisionado de Patentes sólo autoriza la entrega de una muestra del material biológico depositado al que se hace referencia en la solicitud a un experto independiente nominado por el Comisionado, el solicitante debe, mediante una declaración por escrito, informar a la Oficina Internacional como corresponde antes de la finalización de las preparaciones técnicas para la publicación de la solicitud internacional.

AUSTRALIA

[0104] El solicitante por la presente avisa de que la entrega de una muestra de un microorganismo sólo podrá verse afectada antes de la concesión de una patente, o antes del vencimiento, denegación o retirada de la solicitud, a una persona que sea un destinatario cualificado sin interés en la invención.

SINGAPUR

[0105] El solicitante por la presente pide que la entrega de una muestra de un microorganismo sólo solo se hará disponible para un experto.

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Lactobacillus curvatus* depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con el número de registro DSM 18775 **caracterizada por el hecho de que** tiene la capacidad, a una temperatura que varía entre los 2 y los 10 °C, inhibir el crecimiento de al menos una bacteria patógena procedente de los alimentos sin provocar cambios sensoriales en los alimentos.
2. Cepa de *Lactobacillus curvatus* según la reivindicación 1 donde la bacteria patógena procedente de los alimentos es *Listeria monocytogenes*.
3. Cepa de *Lactobacillus curvatus* según la reivindicación 1 o 2 que, además de tener la capacidad de inhibir el crecimiento de al menos una bacteria patógena procedente de los alimentos, también tiene un efecto bactericida en al menos una bacteria patógena procedente de los alimentos a una temperatura que varía entre los 2 y los 10 °C.
4. Composición para conservar un producto alimenticio **caracterizada por el hecho de que** comprende la cepa de *Lactobacillus curvatus* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Composición según la reivindicación 4, donde la composición retrasa el desarrollo de bacterias patógenas procedentes de los alimentos o las bacterias causantes de deterioro.
6. Composición según la reivindicación 4 o 5, donde el producto alimenticio es carne lista para comer (RTE) o un producto lácteo.
7. Proceso para preparar una composición capaz de inhibir el crecimiento de al menos una bacteria patógena procedente de los alimentos, y dicho proceso comprende:
 - (a) cultivar células de una cepa de *Lactobacillus curvatus* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que después del cultivo en un medio de cultivo produce una bacteriocina que produce actividad inhibitoria contra cepas bacterianas, incluida la *Listeria monocytogenes*, para obtener un sobrenadante que comprende la bacteriocina; y
 - (b) separar el sobrenadante de las células cultivadas para obtener el sobrenadante, obteniendo así una composición sobrenadante formada por la bacteriocina.
8. Proceso según la reivindicación 7 que además comprende una fase de secado para obtener un eluato de cultivo deshidratado.
9. Proceso según la reivindicación 8 donde la fase de secado es criodesecación o secado por atomización.
10. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde una cantidad eficaz de la composición inhibitoria de crecimiento tiene un efecto bactericida en al menos una bacteria patógena procedente de los alimentos.
11. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde al menos una bacteria patógena procedente de los alimentos es *Listeria monocytogenes*.
12. Uso de una cepa de *Lactobacillus curvatus* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición sobrenadante de la fase (b) del proceso en la reivindicación 7 para conservar productos alimenticios.
13. Uso de una cepa de *Lactobacillus curvatus* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición sobrenadante de la fase (b) del proceso en la reivindicación 7 para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas procedentes de los alimentos o las bacterias causantes de deterioro en productos alimenticios conservados en estado refrigerado a una temperatura que varía entre los 2 y los 10 °C.
14. Método para controlar la contaminación por *Listeria* en un producto alimenticio, en el equipamiento de procesamiento de alimentos, o en contenedores de almacenaje de alimentos, que comprende aplicar la cepa de *Lactobacillus curvatus* con el número de registro DSM 18775 **caracterizada por el hecho de que** tiene la capacidad, a una temperatura que varía entre los 2 y los 10 °C, de inhibir el crecimiento de al menos una bacteria patógena procedente de los alimentos sin provocar cambios sensoriales en los alimentos, a un producto alimenticio o al equipamiento de procesamiento de alimentos o los contenedores de almacenaje de alimentos en una cantidad suficiente para reducir la cantidad de *Listeria*.

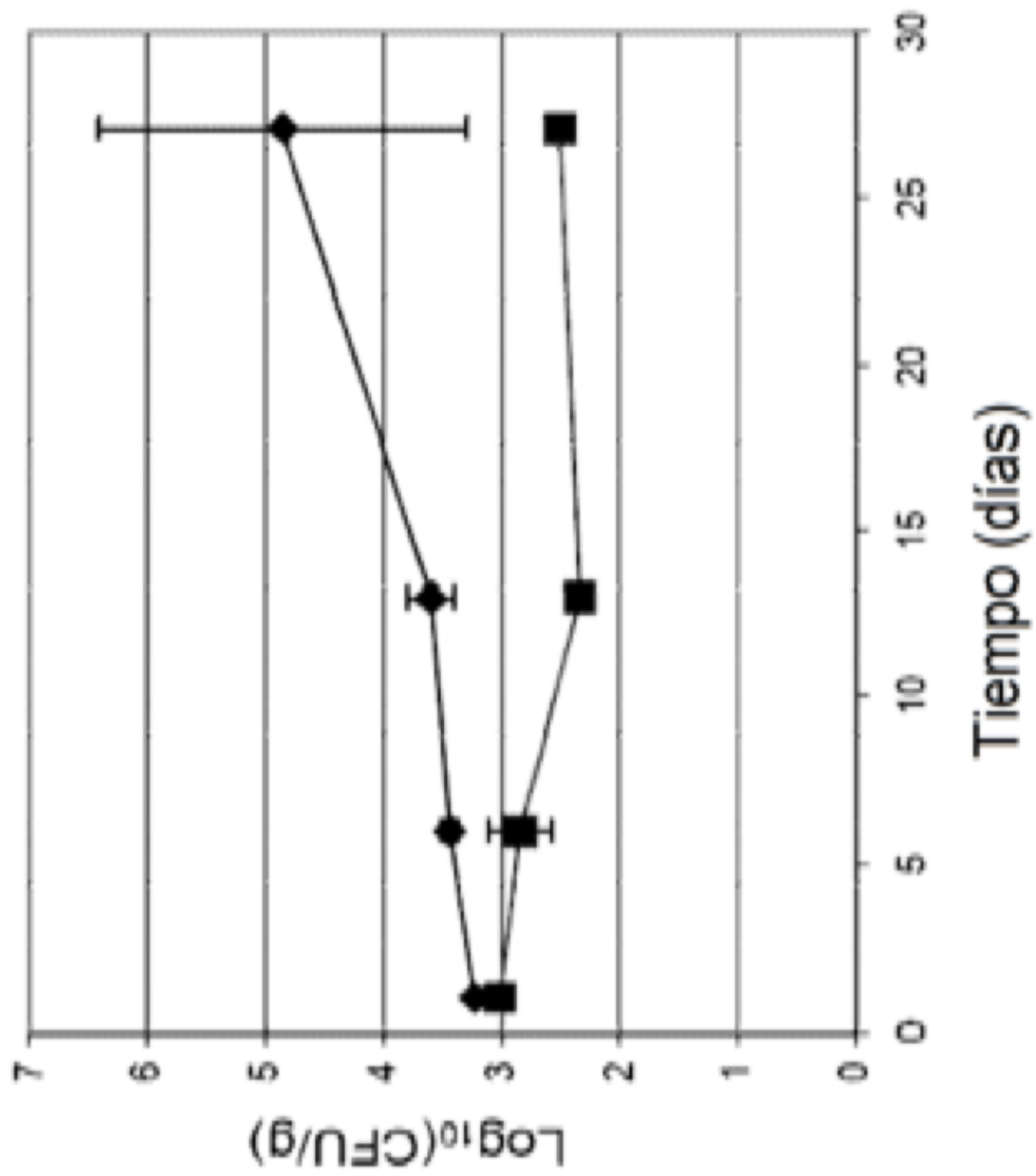
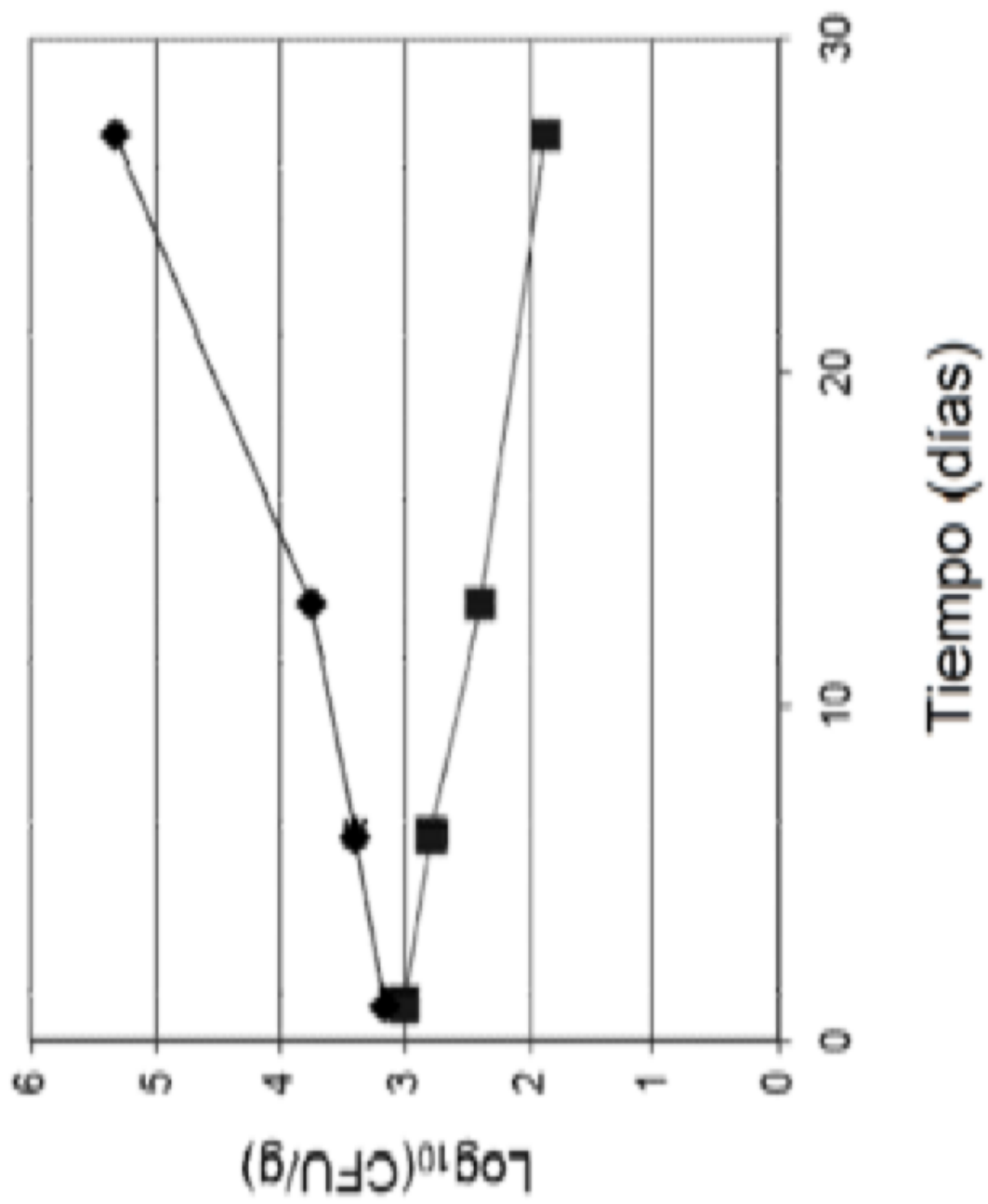
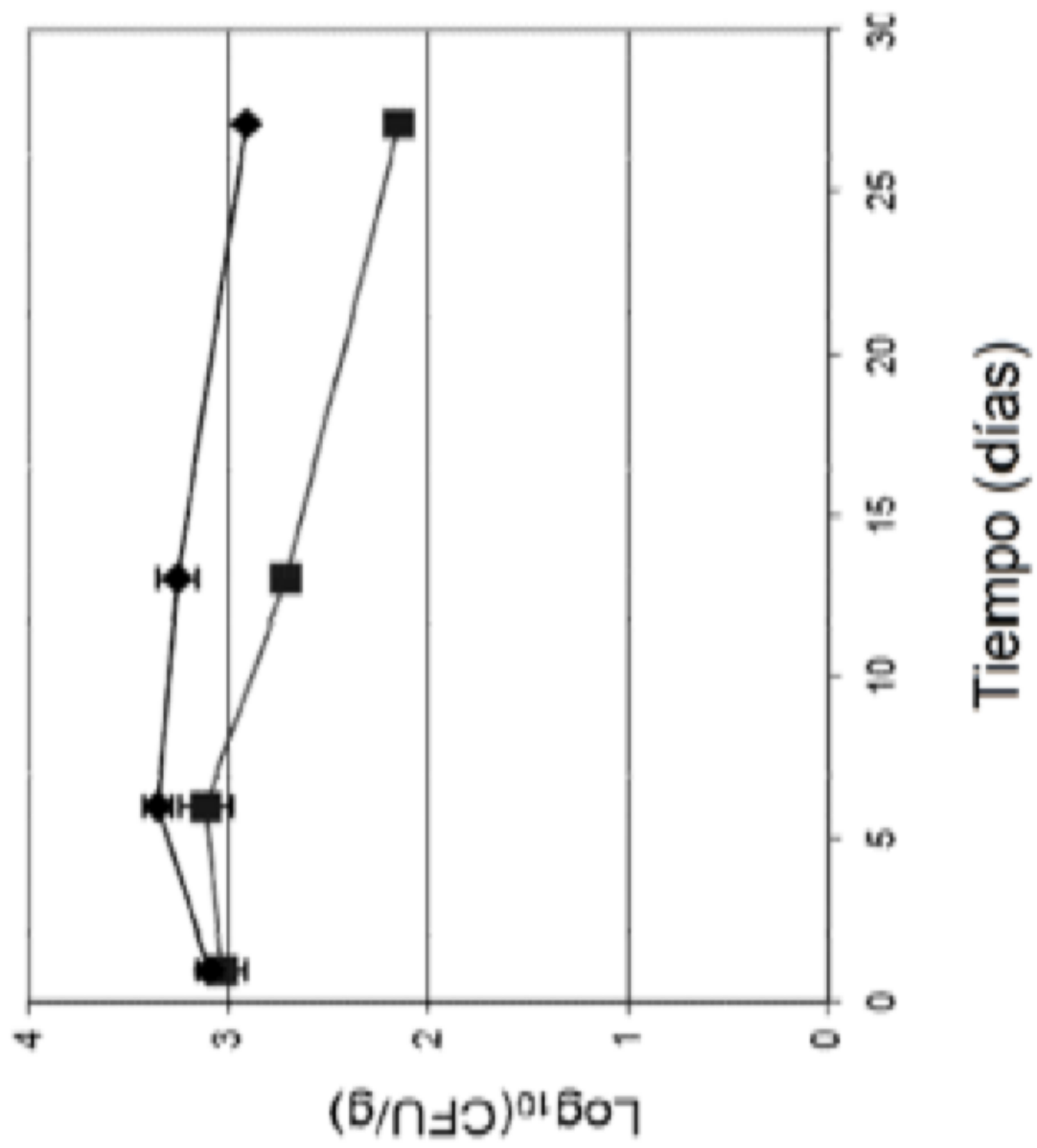
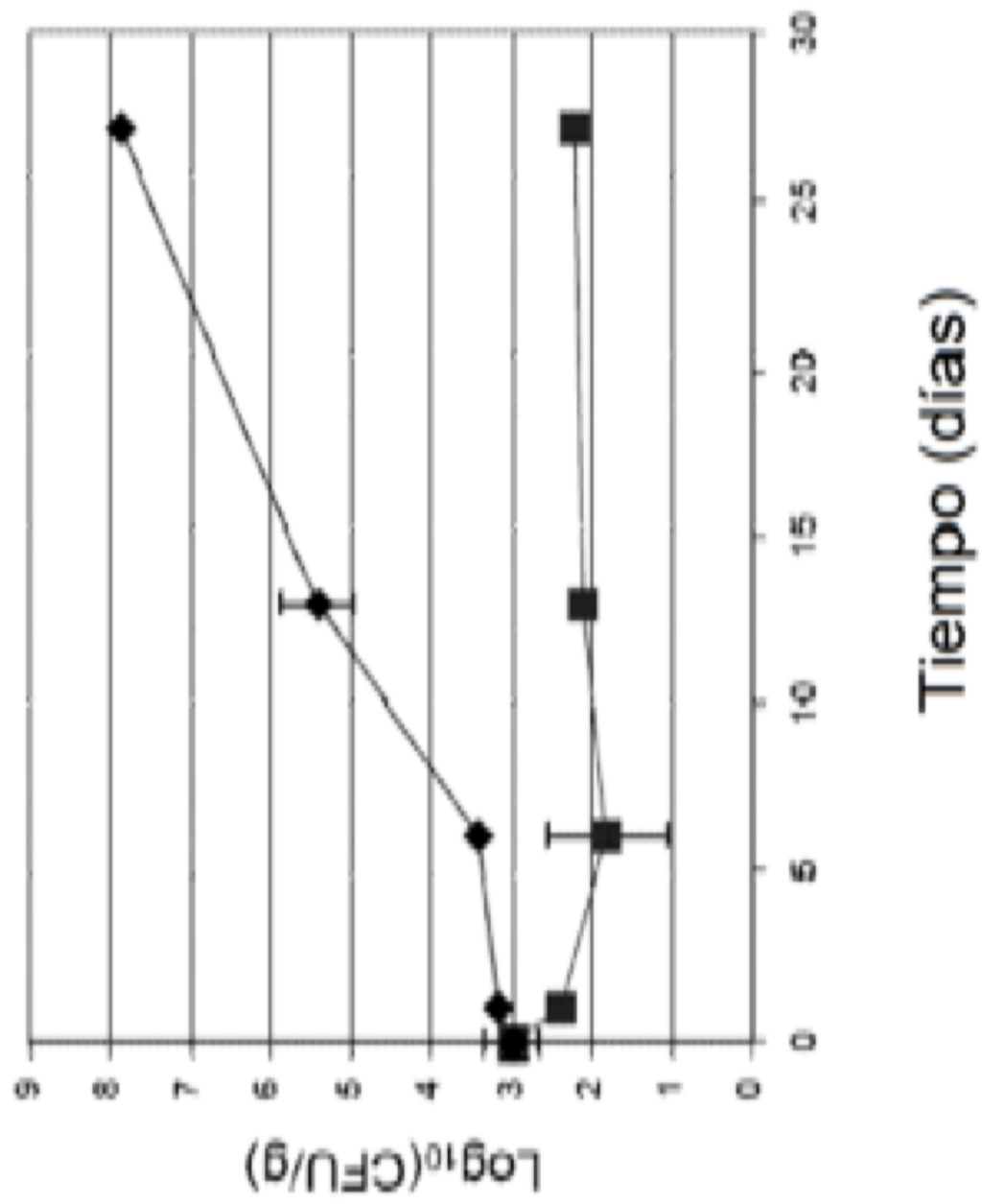
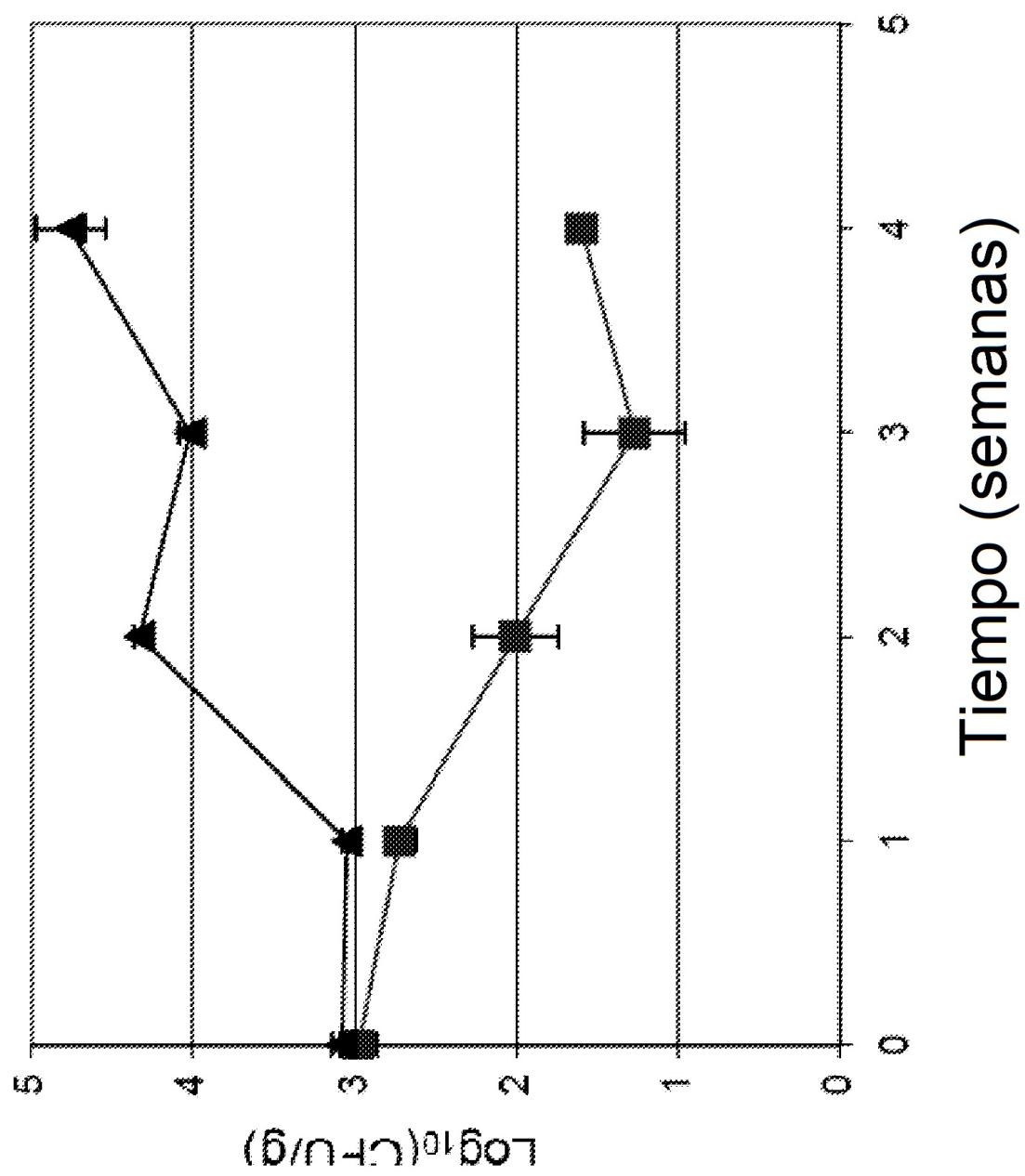


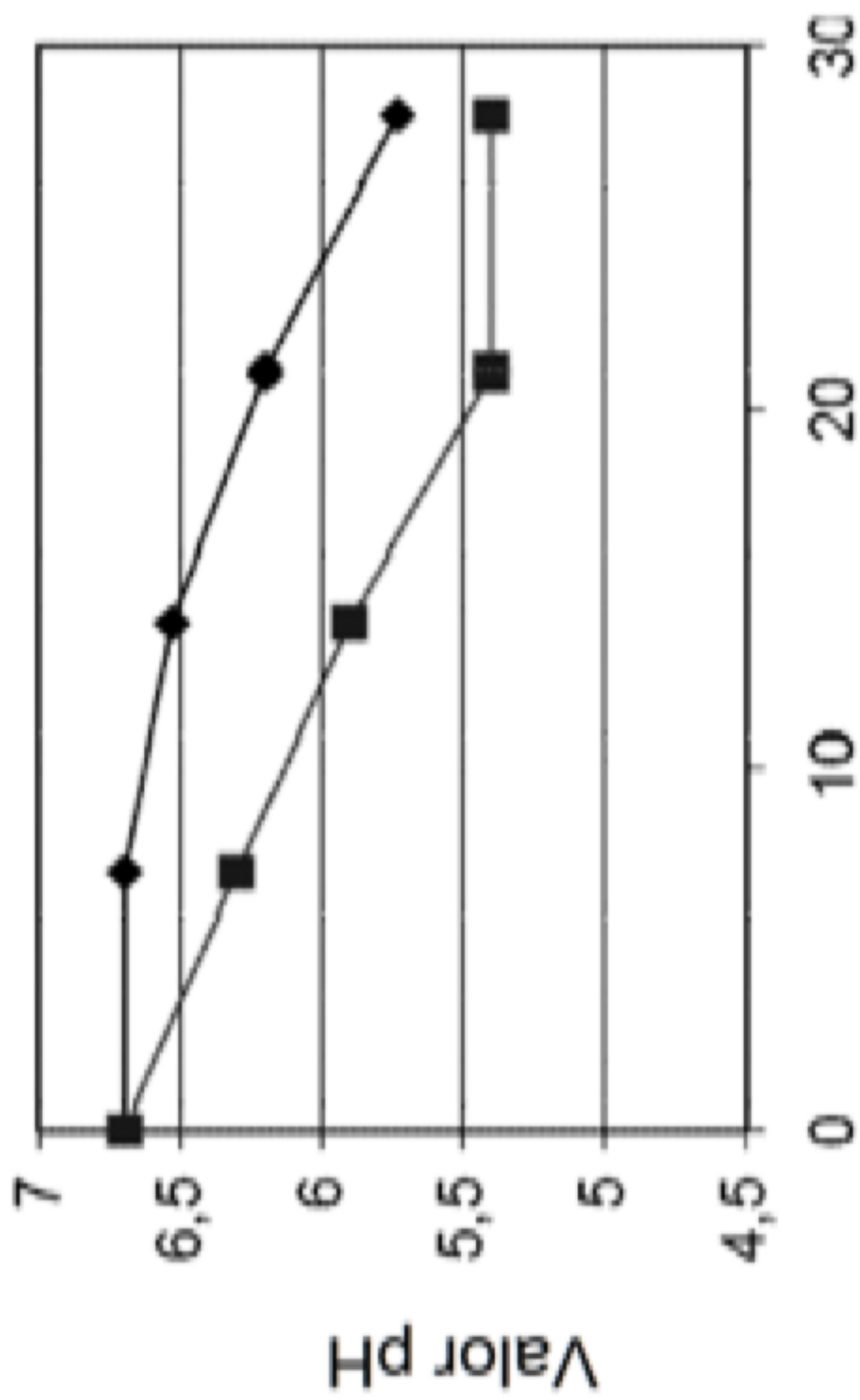
Fig. 1

**Fig. 2**

**Fig. 3**

**Fig. 4**

**Fig. 5**



Tiempo (días)

Fig. 6

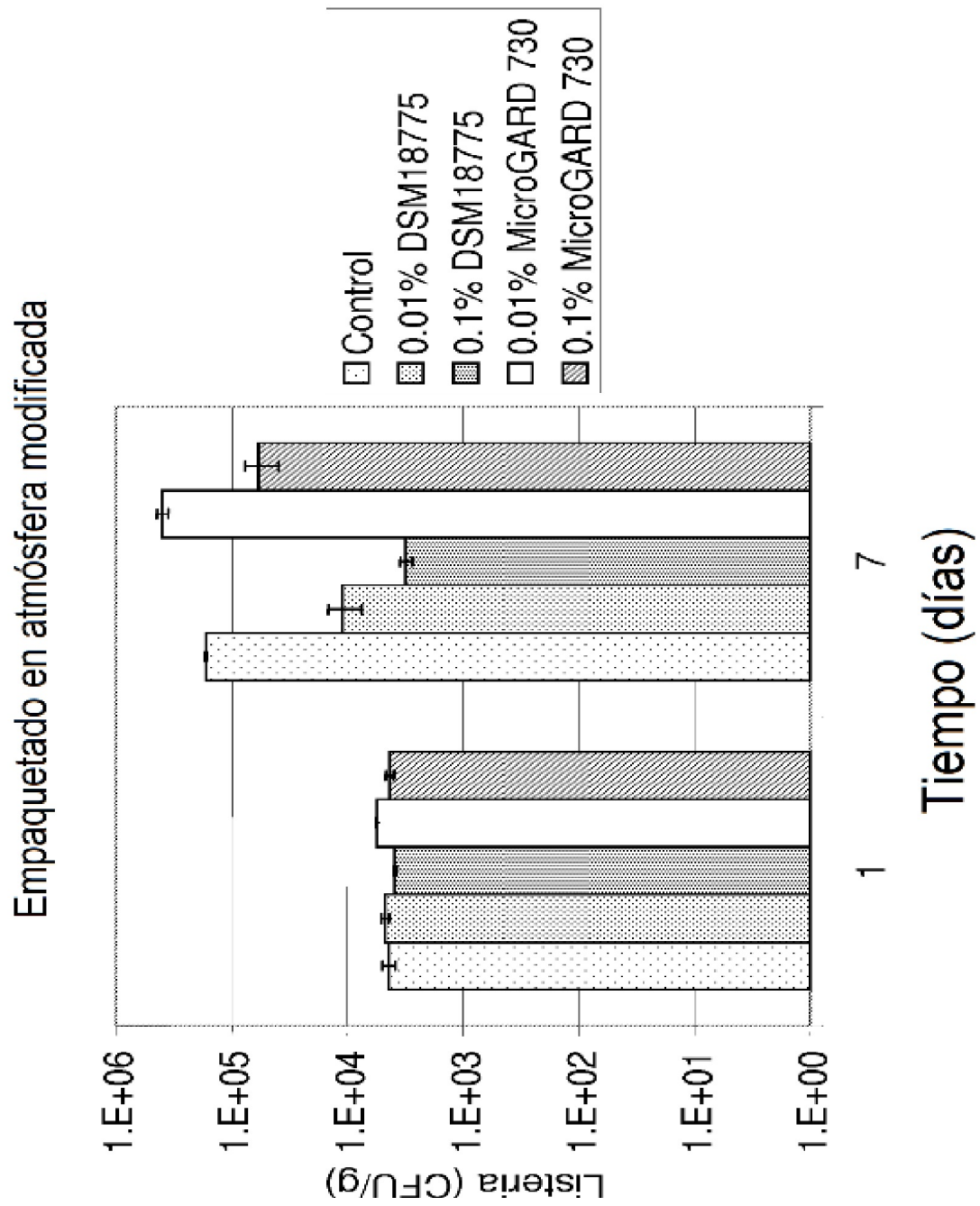


Fig. 7a

