

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 338**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
A23K 10/18 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61K 8/99 (2007.01)
C12R 1/01 (2006.01)
A23L 19/20 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)
A23L 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2009 PCT/KR2009/005139**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.01.2011 WO11007924**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2009 E 09847381 (2)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2455451**

54 Título: **Leuconostoc citreum Novedosa y alimentos fermentados usando la misma como iniciador, y composiciones de la misma**

30 Prioridad:

16.07.2009 KR 20090065024
19.08.2009 JP 2009190443

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.01.2018

73 Titular/es:

CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
CJ Bldg. 500 Namdaemunno 5-ga Jung-gu
Seoul 100-749, KR

72 Inventor/es:

KIM, BONG-JOON;
OH, JI-YOUNG;
KWON, MIN-SOO;
JUNG, HEON-WOONG y
LEE, KANG-PYO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

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

ES 2 649 338 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

Leuconostoc citreum Novedosa y alimentos fermentados usando la misma como iniciador, y composiciones de la misma

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a bacterias *Leuconostoc citreum*, alimentos fermentados usando las bacterias como iniciador, y composiciones que contienen las bacterias. Más particularmente, la presente invención se refiere a *Leuconostoc citreum* que puede inducir la calidad de aroma y de sabor de fermentación de Kimchi fabricado en invierno durante todo un año y, de forma más importante, puede inhibir de forma eficaz el deterioro de la calidad de fermentación en verano, alimentos fermentados usando las bacterias como iniciador, y composiciones que contiene las bacterias.

Antecedentes de la invención

Kimchi es un nombre colectivo de alimentos vegetales fermentados que representan a Corea, que se preparan por salazón de diversas hortalizas, mezclando con diversos aderezos y madurando de forma natural. Especialmente, el Kimchi representativo es Kimchi Gimjang ('김장'), un ingrediente principal del cual es la col coreana, es decir, *Brassica campestris* L. El Kimchi Gimjang se prepara por salazón col coreana y rábano recogido de finales de otoño a principios de invierno, mezclándolos con subingredientes tales como ajo, jengibre, cebolla verde y similares y enterrándolos bajo tierra y se sirve como un alimento de invierno (Cheigh y Park, Biochemical, microbiological and nutritional aspects of Kimchi, Crit. Rev. FoodSci. Nutr. Vol. 34, 1981, páginas 102-127). De esta manera, el Kimchi Gimjang se clasifica como conservas de fermentación frías y se fabrica manteniendo las hortalizas a baja temperatura durante la estación de invierno cuando no se producen las hortalizas, a través de procedimientos de sazonado y fermentación. El Kimchi Gimjang se sirve como fuente de carbono, aminoácidos y vitaminas y proporciona un aroma de fermentación rico formado por los procedimientos de fermentación y la maduración con bacterias acidolácticas únicas en las materias primas.

25 Recientemente, sin embargo, las materias primas tales como las coles coreanas pueden producirse y almacenarse durante todo un año, debido a las mejoras de reproducción y el desarrollo de cultivo y, por lo tanto, el Kimchi de col coreana puede fabricarse incluso aunque no sea la estación de Gimjang (es decir, invierno). Además, la expansión de los frigoríficos y del Kimchi refrigerado posibilitan la conservación de fermentación en frío como si fuera invierno. Como resultado, el Kimchi actual ya no es igual que el Kimchi Gimjang de col coreana tradicional.

30 Básicamente, la calidad del Kimchi cambia significativamente dependiendo de las diversas materias primas tales como la col coreana que recientemente se consigue durante todo el año. El cambio en la calidad del Kimchi ha llegado a ser un obstáculo para proporcionar productos que tengan calidad constante para los usuarios, especialmente en una posición de empresas que comercializan Kimchi. Especialmente, el Kimchi fabricado en verano (junio - agosto) tiene problemas como baja calidad de las materias primas y deterioro del aroma de fermentación-maduración aunque el Kimchi se fabricara por el mismo procedimiento de fermentación y de maduración que en invierno. Es bien sabido en la técnica que una amplia variación en la calidad dependiendo de la estación ha provocado diversas reclamaciones de calidad por usuarios insatisfechos.

40 Las técnicas anteriores para resolver los problemas han intentado controlar la calidad del Kimchi añadiendo diversos microorganismos, principalmente bacterias acidolácticas, como iniciador (patentes coreanas n.º 10-0536108, 10-0181009, 10-0330674 y similares). Las técnicas anteriores, sin embargo, aplicaban iniciadores simplemente para mejorar la calidad o confirmaban que había una diferencia de la calidad de sabor general en el ensayo sensorial, independientemente de la estación; no investigaban las causas del cambio en la calidad durante el año. Por consiguiente, no hay técnica anterior que se centre en la mejora de la calidad del Kimchi de verano, analice las causas del deterioro de la calidad y resuelva los problemas.

45 Mientras tanto, se han usado bacterias acidolácticas de Kimchi tales como *Leuconostoc Kimchii*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc mensenteroides*, *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus sakei* individualmente o en combinación en la fabricación de diversos alimentos fermentados.

50 Entre ellos, las bacterias *Leuconostoc citreum* están implicadas en la maduración del Kimchi y se conocen en cuanto a su capacidad de producir mucílagos poliméricos, dextrano, con azúcar (patente coreana n.º 10-0718344) y por ser eficaz para el tratamiento y la prevención de la dermatitis atópica (solicitud de patente coreana n.º 10-2005-0041572). Además, la patente coreana n.º 10-0814665 divulga bacterias *Leuconostoc citreum* S5 que producen dextrano y un procedimiento de producción de productos fermentados que comprenden el dextrano usando las bacterias y la patente coreana n.º 10-080053 divulga *Leuconostoc citreum* que produce manitol y un procedimiento de producción de manitol usando las bacterias. Kim y col., (International Journal of Systematic and Evolutional Microbiology, Volumen 53, julio de 2003, páginas 1123-1126) describe el aislamiento de especies de *Leuconostoc* incluyendo *Leuconostoc citreum* de Kimchi. El documento US 2006/029692 describe un procedimiento para preparar polvo que comprende Kimchi que comprende añadir bacterias acidolácticas tales como *Leuconostoc citreum*.

Sumario de la invención

Los presentes inventores analizaron los patrones de fermentación del Kimchi de col coreana durante un año y controlaron los cambios de la flora de bacterias acidolácticas y los ácidos orgánicos que causan los cambios de la calidad de la fermentación.

5 Haciendo esto, los presentes inventores descubrieron que las bacterias acidolácticas aisladas de Kimchi fabricado en invierno cuando puede fabricarse el Kimchi más delicioso, tienen una función significativa en la mejora y la estabilización de la calidad durante todo el año. Además, los presentes inventores descubrieron que las bacterias acidolácticas pueden inducir la calidad de aroma y sabor de fermentación del Kimchi de invierno e inhiben de forma eficaz el deterioro de la calidad de la fermentación en verano.

10 Por lo tanto, un fin de la presente invención es proporcionar novedosas bacterias acidolácticas *Leuconostoc* spp. que puedan usarse como iniciador para Kimchi, inducir la calidad de aroma y de sabor de fermentación del Kimchi de invierno e inhibir de forma eficaz el deterioro de la calidad de fermentación en verano.

Además, otro fin de la presente invención es proporcionar alimentos fermentados fabricados usando las novedosas bacterias acidolácticas *Leuconostoc* spp. como iniciador.

15 Además, otro fin de la presente invención es proporcionar una composición de bacterias que contenga las novedosas bacterias acidolácticas *Leuconostoc* spp.

Para conseguir dichos fines, la presente invención proporciona *Leuconostoc citreum* CJGN 34 (*Leuconostoc citreum* CJGN34) (depositada en la Korean Type of Collection Culture (KCTC) el 27. 07. 2006, número de acceso: KCTC 10974BP).

20 Además, la presente invención proporciona una composición iniciadora para fermentar alimentos, que contiene *Leuconostoc citreum* CJGN 34 como ingrediente activo.

Además, la presente invención proporciona alimentos fermentados tales como Kimchi fabricado usando las composiciones iniciadoras.

25 Además, la presente invención proporciona una composición de bacterias acidolácticas que contiene *Leuconostoc citreum* CJGN 34 como ingredientes activos.

Un término "ingrediente activo" usado en la presente memoria descriptiva significa un material o grupo de materiales (incluyendo hierbas medicinales que contienen cualquier ingrediente activo farmacéutico no identificado) que está contenido como componente principal y se espera que muestre eficacia farmacéutica directa o indirectamente o el efecto de un medicamento mediante acción farmacológica inherente.

30 **Breve descripción de los dibujos**

La fig. 1 es un gráfico que muestra la media de los valores de sabor general dependiendo de la estación en que se preparó el Kimchi.

La fig. 2 es un gráfico que muestra el porcentaje de bacterias aisladas de la flora de bacterias de fermentación dependiendo de la estación en que se preparó el Kimchi.

35 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se explica más particularmente de la siguiente manera.

40 *Leuconostoc citreum* CJGN 34 de la presente invención se caracteriza por ser una novedosa bacteria *Leuconostoc citreum* aislada de Kimchi e identificada. Aunque la bacteria se aisló de Kimchi fabricado en la estación de Gimjang (es decir, invierno), no significa que una gama de las bacterias de acuerdo con la presente invención esté limitada a la misma.

De acuerdo con los resultados de análisis de la secuencia de bases del ARNr 16S para identificar y clasificar un organismo, *Leuconostoc citreum* CJGN 34 de la presente invención tiene la máxima homología con la bacteria de referencia *Leuconostoc citreum* (*Leuconostoc citreum* KCTC 3256^T, número de acceso a GenBank AF11948), lo que significa que la *Leuconostoc citreum* CJGN 34 de la presente invención tiene la relación filogenética molecular 45 máxima con *Leuconostoc citreum*. Por lo tanto, el microorganismo se identificó como *Leuconostoc citreum*, llamado *Leuconostoc citreum* CJGN 34 y se depositó en el Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) el 27 de julio de 2006 (número de acceso: KCTC 10974BP).

50 *Leuconostoc citreum* CJGN 34 de la presente invención es una bacteria gram positiva y anaerobio facultativo que puede crecer en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Además, *Leuconostoc citreum* CJGN 34 de la presente invención no forma una endospora, no tiene motilidad y tiene una forma de monococo o de diplococo. Se realizaron procedimientos convencionales en la técnica para analizar la forma específica y las propiedades fisiológicas de *Leuconostoc citreum* CJGN 34 y el resultado se resume en la siguiente tabla 1.

Tabla 1.

| | |
|----------------------------|---|
| manitol | + |
| sorbitol | - |
| D-manósido | - |
| D-glucósido | + |
| Glucosamina | + |
| amigdalina | + |
| arbutina | + |
| esculina | + |
| salicina | + |
| celobiosa | + |
| maltosa | + |
| lactosa | - |
| melibiosa | - |
| sacarosa | + |
| trehalosa | + |
| inulina | - |
| melizitosa | - |
| D-rafinosa | - |
| almidón | - |
| glucógeno | - |
| xilitol | - |
| gentiobiosa | - |
| D-turanosa | + |
| D-lixosa | - |
| D-tagatosa | - |
| D-fucosa | - |
| D-arabitol | - |
| L-arabitol | - |
| gluconato | - |
| 2-gluconato | - |
| 5-gluconato | - |
| +: positivo -: negativo | |

5 Preferentemente, *Leuconostoc citreum* CJGN 34 de la presente invención puede almacenarse a -70 °C después de añadirse a un líquido de conservación compuesto por agua y glicerol en una cantidad o puede liofilizarse después de suspenderse en leche desnatada al 10 % esterilizada, durante un almacenamiento estable prolongado.

10 Además, *Leuconostoc citreum* CJGN 34 de la presente invención, que es una bacteria acidoláctica aislada de Kimchi fermentado de forma natural, se clasificó como bacteria GRAS (reconocida generalmente como segura) para un ser humano y se confirmó que es negativa en todas las evaluaciones de seguridad tales como ensayo de licuación de gelatina, ensayo de fenilalanina desaminasa, ensayo de amonificación y ensayo de hemólisis, lo que significa que la bacteria es segura como material alimenticio.

En el caso de que *Leuconostoc citreum* CJGN 34 de acuerdo con la presente invención se use en alimentos fermentados tales como Kimchi como iniciador, puede mejorar la calidad de sabor general de los alimentos, mantener la calidad de fermentación constantemente durante todo el año mejorando un sabor ácido y carbonatado complejo que es un sabor representativo de Kimchi Gimjang fabricado tradicionalmente en invierno y, especialmente, inhibe de forma eficaz el deterioro de la calidad de fermentación en verano cuando disminuye la calidad del sabor.

Además, puede prepararse una composición de bacterias cultivando y recogiendo la flora bacteriana que incluye las bacterias. La composición de bacterias puede usarse de acuerdo con procedimientos convencionales en diversas industrias tales como probióticos alimenticios después de mezclarse con materiales alimenticios tales como cereal en polvo; probióticos alimenticios o probióticos de medicamentos en una forma de comprimidos o cápsulas después de mezclarse con vehículos o aditivos; o cosméticos después de mezclarse con los otros ingredientes cosméticos en una cantidad.

Además, *Leuconostoc citreum* CJGN 34 de acuerdo con la presente invención puede usarse en una composición farmacéutica de bacterias acidolácticas. En este caso, puede formularse en formas convencionales de dosificación farmacéutica conocidas en la técnica. Puede formularse preferentemente en formas orales de dosificación tales como líquido, suspensión, polvo, gránulo, comprimido, cápsula, bolo, píldora o extracto.

En la formulación en una forma respectiva de dosificación, pueden añadirse vehículos o aditivos farmacéuticamente aceptables o necesarios en la fabricación de la forma de dosificación. Por ejemplo, pueden usarse al menos un vehículo seleccionado de diluyentes, agentes deslizantes, agentes de unión, agentes disgregantes, agentes edulcorante, estabilizantes y agentes conservantes; y al menos un aditivo seleccionado de agentes aromatizantes, vitaminas y antioxidantes en la formulación de las formas orales de dosificación.

Puede usarse cualquier vehículo y aditivo farmacéuticamente aceptable. Específicamente, puede ser preferente que se use lactosa, almidón de maíz, aceite de soja, celulosa microcristalina o manitol como diluyentes; se usa estearato de magnesio o talco como agentes deslizantes; se usa polivinilpirrolidona o hidroxipropilcelulosa como agentes de unión. Además, puede ser preferente que se use carboximetilcelulosa de calcio, almidón glicolato de sodio, poliácridina de potasio o crospovidona como agentes disgregantes; se usa azúcar blanco, fructosa, sorbitol o aspartamo como agentes edulcorantes; se usa carboximetilcelulosa de sodio, β -ciclodextrina, cera blanca o goma xantana como estabilizantes; y se usa p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo o solvato de potasio como agentes conservantes.

Además, además de los ingredientes anteriores, pueden usarse hierbas naturales con aroma Maesil (albaricoque japonés), aroma de limón, aroma de piña o aroma de hierbas, zumo de frutas natural, pigmentos naturales tales como clorofilina o flavonoide, ingredientes edulcorantes tales como fructosa, miel, alcohol de azúcar o azúcar, acidificantes tales como ácido cítrico o citrato de sodio después de mezclar con el fin de aumentar el apetito.

Los procedimientos de formulación y vehículos y aditivos necesarios para dicha formulación se detallan en Remington's Pharmaceutical Sciences (19.^a ed., 1995).

Además, *Leuconostoc citreum* CJGN 34 de acuerdo con la presente invención puede usarse en una composición alimenticia de bacterias acidolácticas. La composición alimenticia cubre los alimentos generales consumidos diariamente convencionales, así como alimentos saludables. Si la composición alimenticia se usa en los alimentos saludables, puede formularse en formas de dosificación de alimentos saludables convencionales conocidas en la técnica, con vehículos o aditivos sitiológicamente aceptables. Los alimentos saludables pueden formularse, por ejemplo, en forma de polvo, granulo, comprimido, capsula, suspensión, emulsión, jarabe, líquido, extracto, gelatina o bebida. Como vehículos o aditivos sitiológicamente aceptables, puede usarse un vehículo o aditivo arbitrario útil en cualquier forma para prepararla.

Además, como *Leuconostoc citreum* CJGN 34 de acuerdo con la presente invención puede comprender dextrano, un polímero con una alta capacidad de absorción de humedad, puede usarse en una composición cosmética de bacterias acidolácticas. La composición cosmética de acuerdo con la presente invención puede formularse en una forma convencional conocida para las industrias cosméticas. Puede añadirse cualquier vehículo o aditivo que se aceptable y necesario en la fabricación de una forma cosmética específica.

Además, *Leuconostoc citreum* CJGN 34 de acuerdo con la presente invención puede usarse en aditivos alimenticios de bacterias acidolácticas o composiciones alimenticias.

Usada en los aditivos alimenticios, la composición puede fabricarse en una forma de un 20 a un 90 % de líquido altamente concentrado, polvos o gránulos. El aditivo alimenticio puede incluir además al menos uno seleccionado de ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, ácido humalic, ácido adípico, ácido láctico y ácido málico; fosfatos tales como fosfato de sodio, fosfato de potasio, pirofosfatos ácidos y polifosfatos (fosfato condensado); y antioxidantes naturales tales como polifenoles, catequinas, alfa-tocoferoles, extractos de romero, vitamina C, extractos de té verde, extractos de regaliz, quitosano, ácidos tánicos y ácidos fítics. Usada en la composición alimenticia, la composición puede fabricarse en una forma convencional de alimento para animales e incluye ingredientes alimenticios convencionales.

Los aditivos alimenticios y el alimento para animales pueden incluir además, cultivos, por ejemplo, trigo molido o triturado, avena, cebada, maíz y arroz; alimentos proteínicos vegetales, por ejemplo, alimentos que consisten principalmente en colza, soja y girasol; alimentos proteínicos animales, por ejemplo, harina de sangre, harina de carne, harina de huesos y harina de pescado; y azúcar y productos lácteos, por ejemplo, diversos ingredientes secos que consisten en leche en polvo y lactosuero en polvo, y pueden incluir adicionalmente suplementos nutricionales, potenciadores de la digestión y de la absorción y promotores del crecimiento.

Los aditivos alimenticios pueden administrarse a animales individualmente o en combinación con otros aditivos seleccionados de vehículos comestibles. Además, los aditivos alimenticios pueden recubrir, pueden mezclarse directamente con alimentos para animales o pueden administrarse fácilmente a animales como formas orales de dosificación por separado de los alimentos para animales. En el caso de administrarse por separado de los alimentos para animales, los aditivos alimenticios pueden combinarse con vehículos comestibles farmacéuticamente aceptables y prepararse en formulaciones de liberación inmediata o formulaciones de liberación sostenida, como se sabe bien en la técnica. Los vehículos comestibles pueden ser sólidos o líquidos, por ejemplo, almidón de maíz, lactosa, sacarosa, copos de soja, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo y propilenglicol. En el caso de que se usen vehículos sólidos, los aditivos alimenticios pueden estar en forma de comprimido, cápsula, polvo, trocisco o grajea, o pueden ser un recubrimiento no dispersado. Si se usan vehículos líquidos, los aditivos alimenticios pueden tener una forma de cápsulas de gelatina blanda, jarabe, suspensión, emulsión o solución.

Los alimentos pueden incluir una harina de cereal orgánica que contiene proteína arbitraria que se ha usado convencionalmente para satisfacer el apetito de los animales. La harina de cereal que contiene proteína típicamente consiste en harina de maíz o de soja o es una mezcla de harina de maíz/soja.

Además, los aditivos alimenticios y los alimentos para animales pueden contener adyuvantes tales como conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes y agente de licuación. Los aditivos alimenticios pueden añadirse a alimentos para animales mediante inmersión, pulverización o mezcla para su uso.

Los alimentos para animales o los aditivos alimenticios de acuerdo con la presente invención pueden aplicarse a una dieta para diversos animales tales como mamíferos, aves de corral y peces. Los mamíferos pueden ser mascotas (por ejemplo, perros, gatos), así como cerdos, vacas, ovejas, cabras y roedores de laboratorio; aves de corral tales como pollos, pavos, patos, gansos, faisanes y codornices; y peces tales como trucha, sin limitación a ello.

Como se divulga anteriormente, en el caso de que se use una novedosa *Leuconostoc citreum* CJGN 34 de acuerdo con la presente invención como iniciador para alimentos fermentados tales como Kimchi, puede mejorar la calidad de sabor general, aumentar un sabor ácido y carbonatado complejo que es un sabor único de Kimchi fabricado por procedimientos tradicionales en invierno y, por consiguiente, mantener la calidad de fermentación constante durante todo el año e inhibir de forma eficaz el deterioro de la calidad de fermentación en verano cuando se deteriora la calidad del sabor de Kimchi. La novedosa *Leuconostoc citreum* CJGN 34 de acuerdo con la presente invención puede utilizarse como iniciador para alimentos fermentados tales como Kimchi después de prepararse como una composición bacteriana; como probiótico alimenticio o de medicamento en una forma de comprimido o cápsula después de mezclarse con vehículos o aditivos; o materiales cosméticos después de mezclarse con otros materiales cosméticos en una cantidad. Es decir, la novedosa *Leuconostoc citreum* CJGN 34 de acuerdo con la presente invención puede utilizarse en diversas industrias tales como medicamentos, piensos y cosméticos.

A partir de ahora en el presente documento, la presente invención se describirá por los siguientes ejemplos en más detalle. Sin embargo, el fin de estos ejemplos es únicamente ilustrar la presente invención, no limitar el alcance de la invención a los mismos de ninguna manera.

Ejemplo 1: Deducción de los aspectos de mejora controlando el cambio de calidad del Kimchi durante un año y aislado bacterias GN34

El cambio de calidad de Kimchi se controló durante un año para encontrar las causas del cambio de calidad y para mejorar la calidad.

Se usó el Kimchi fabricado de acuerdo con el procedimiento de fabricación de CJ CheilJedang. El Kimchi fabricado entre marzo y el 15 de mayo, se clasificó como Kimchi de primavera; el fabricado entre el 16 de mayo y el 16 de agosto como Kimchi de verano; el fabricado entre septiembre y el 15 de noviembre como Kimchi de otoño; y el fabricado entre el 16 de noviembre y febrero como Kimchi de invierno.

Como resultado del análisis de la calidad del sabor del Kimchi fabricado en cada estación en un ensayo sensitivo por una escala de 5 puntos, se descubrió que el Kimchi de verano tenía un bajo valor de aproximadamente 3,5 para un punto de sabor general, mientras que el Kimchi fabricado en las otras estaciones tiene un intervalo promedio de 3,8 a 4,0. Los resultados anteriores se muestran en la fig. 1.

Para analizar el efecto microbiano de fermentación sobre el cambio en la calidad del sabor durante todo un año, se realizó la identificación por análisis de ARNr 16S de acuerdo con el procedimiento divulgado en Choi (Choi y col., Microbial population dynamics of kimchi, a fermented cabbage, FEMS microbial. Lett., Vol. 257, 2006, páginas 262-267). El resultado indica que el Kimchi fabricado durante la estación Gimjang tradicional, es decir, en invierno, tiene

más de un 80 % de *Leuconostoc spp.* que produce diversos ácidos y gases, además de ácido láctico, con azúcar a través de un procedimiento de heterofermentación absoluta. Como el Kimchi fabricado en invierno tiene la calidad de sabor más sobresaliente, puede concluirse que *Leuconostoc spp.* tiene un efecto importante en proporcionar un aroma complejo de fermentación y sabor carbonatado del Kimchi de invierno. Por otro lado, se descubrió que la relación de *Lactobacillus spp.* que causa heterofermentación u homofermentación parcial en la que se produce solamente ácido láctico, no gas, usando azúcar en un entorno general, por ejemplo, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus plantarum*, era de más de un 50 % en el Kimchi fabricado en verano cuando se deteriora la calidad de la fermentación. La relación es mayor que la del Kimchi fabricado en las otras estaciones, que da lugar a una conclusión de que el cambio de la flora bacteriana de fermentación puede ser una causa del sabor ácido simple y el débil sabor carbonatado del Kimchi de verano. Los resultados anteriores se muestran en la fig. 2.

Para aclarar el efecto del cambio en la flora bacteriana de fermentación sobre el aroma de fermentación del Kimchi, se realizó un análisis de HPLC de los ácidos orgánicos en la misma muestra que la usada en el análisis de microorganismos, de acuerdo con los procedimientos de Choi. En la muestra, la fermentación había empezado y la acidez total era de más de un 0,4 %. Los ácidos orgánicos corresponden a metabolitos principales que producen ácido láctico después de consumir azúcar. Como el ácido láctico se produce principalmente en heterofermentación u homofermentación parcial y el ácido acético y el dióxido de carbono, así como el ácido láctico se producen como productos de fermentación en heterofermentación absoluta, los ácidos orgánicos son el marcador principal que informa del tipo de fermentación. Los resultados del análisis se muestran en la tabla 2.

Como se sabe por la tabla 2, la relación molar de ácido láctico a ácido acético en el Kimchi de primavera, el Kimchi de otoño y el Kimchi de invierno estaba en el intervalo de aproximadamente 1,3 ~ 1,6, mientras que en el Kimchi de verano estaba en un intervalo de aproximadamente 2,2 ~ 2,8, lo que significa que la proporción de ácido láctico aumentaba. Puede concluirse que el cambio de las bacterias acidolácticas de fermentación aumenta en homofermentación, especialmente en verano, que es responsable del deterioro de la calidad de Kimchi de verano.

25

Tabla 2.

| estación de fabricación | N.º de muestra | Relación de concentración de ácido láctico/ácido acético |
|-------------------------|-----------------------|--|
| primavera | Kimchi 1 de primavera | 1,5±0,08 |
| primavera | Kimchi 2 de primavera | 1,6±0,11 |
| verano | Kimchi 1 de verano | 2,8±0,13 |
| verano | Kimchi 2 de verano | 2,2±0,09 |
| verano | Kimchi 3 de verano | 2,4±0,25 |
| verano | Kimchi 4 de verano | 2,8±0,13 |
| otoño | Kimchi 1 de otoño | 1,4±0,09 |
| invierno | Kimchi 1 de invierno | 1,4±0,25 |
| invierno | Kimchi 2 de invierno | 1,5±0,39 |
| invierno | Kimchi 3 de invierno | 1,3±0,02 |
| invierno | Kimchi 4 de invierno | 1,3±0,09 |

Basándose en el resultado anterior, los presentes inventores pudieron fabricar Kimchi con una calidad de fermentación constante durante todo el año aplicando bacterias acidolácticas aisladas de Kimchi de invierno que tiene la mejor calidad de sabor, como iniciador. Además, los presentes inventores pudieron aislar aproximadamente 500 bacterias de Kimchi de invierno para inhibir el deterioro de la calidad de fermentación del Kimchi de verano. Especialmente, los presentes inventores pudieron aislar novedosas bacterias acidolácticas que son bacterias de heterofermentación absoluta y especies dominantes de Kimchi de invierno y cumplen el fin de la presente invención.

Ejemplo 2: Aislamiento e identificación del microorganismo *Leuconostoc citreum* CJGN34

En el ejemplo 1 anterior, se analizaron las causas responsables del cambio de calidad del Kimchi durante un año y se aislaron las bacterias acidolácticas del Kimchi de invierno delicioso bien madurado. Las bacterias acidolácticas se llamaron *Leuconostoc citreum* CJGN34. Las bacterias acidolácticas *Leuconostoc citreum* CJGN34 se sembraron en estrías en medio MRS sólido (Difco, EE. UU.) que contenía agar al 1,5 % y se incubaron a 30 °C durante 24 h. Las colonias confirmadas como separadas de forma pura se recogieron por un asa y se incubaron con caldo MRS (Difco, EE. UU.) a 30 °C durante 18 a 24 h.

Después, se determinaron la morfología y las propiedades fisiológicas de la bacteria *Leuconostoc citreum* CJGN34 con los kits API50CH y API50CHL (Bio-Me'reux) de acuerdo con los procedimientos divulgados en Kim y col.,

Leuconostoc inhae sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from kimchi, International Journal of Systematic and Evolutional Microbiology, Volumen 53, julio de 2003, páginas 1123-1126. La morfología y las propiedades fisiológicas resultantes de la bacteria *Leuconostoc citreum* CJGN34 se resumen en la tabla 1 anterior.

Además, se analizó una secuencia de ARNr 16S para la identificación y la clasificación de las bacterias acidolácticas. se determinó la secuencia del gen de ARNr 16S y se analizó de acuerdo con el procedimiento divulgado en Kim y col., *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. International Journal of Systematic and Evolutional Microbiology, Volumen 50, septiembre del 2000, páginas 1915-1919.

Como *Leuconostoc citreum* CJGN34 de acuerdo la presente invención tiene la máxima homología (99,7 %) con la bacteria de referencia *Leuconostoc citreum* (KCTC 3526^T, número de acceso a GenBank AF111948), *Leuconostoc citreum* CJGN34 de acuerdo con la presente invención se identificó como *Leuconostoc citreum*, llamada *Leuconostoc citreum* CJGN34 y depositada en el Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology(KRIBB) 27 de julio de 2006 (número de acceso: KCTC 10974BP).

Ejemplo 3: Evaluación de seguridad de *Leuconostoc citreum* CJGN34

Se realizaron un ensayo de hemólisis, un ensayo de licuación de gelatina, un ensayo de metabolitos peligrosos (amonificación) y un ensayo de fenilalanina desaminasa de acuerdo con los procedimientos de evaluación de seguridad sugeridos por la normal de la Korea Biotechnology Industry Organization para evaluar la seguridad de las bacterias aisladas del ejemplo 1. El resultado obtenido se resume en la tabla 3.

Tabla 3.

| Evaluación de seguridad para <i>Leuconostoc citreum</i> CJGN34 | | | | |
|--|-----------------------|-------------------------|-----------|---------------|
| bacteria | Ensayos | | | |
| | licuación de gelatina | fenilalanina desaminasa | hemólisis | amonificación |
| CJGN34 | negativo | negativo | negativo | negativo |

Basándose en el resultado anterior, se descubrió que *Leuconostoc citreum* CJGN34 era negativa en todos los ensayos, el ensayo de licuación de gelatina, el ensayo de metabolitos peligrosos (amonificación), el ensayo de fenilalanina desaminasa y el ensayo de hemólisis. Por consiguiente, se confirmó que *Leuconostoc citreum* CJGN34 era segura para su administración a un ser humano.

Ejemplo 4: Características de Kimchi fabricado usando *Leuconostoc citreum* CJGN34 como iniciador

Se preparó un cultivo bacteriano o una composición de bacterias del siguiente modo para aplicar *Leuconostoc citreum* CJGN34 de acuerdo con la presente invención como iniciador.

Se preparó medio de cultivo disolviendo 10 g de glucosa, 5 g de extractos de levadura y 5 g de citrato de amonio en agua, esterilizando, inoculando con bacterias e incubando a 25 ~ 37 °C durante 8 a 24 h. Se preparó una composición de bacterias del siguiente modo: se incubaron bacterias y se cultivaron a 30 °C durante aproximadamente 18 h con un ajuste de pH del caldo MRS (Difco) a 5,5 ~ 7,0 por gas amoniacado y se centrifugaron para su recuperación. Las bacterias recuperadas se liofilizaron por debajo de -40 °C con un crioprotector que consiste en dextrina al 5 % y leche desnatada al 10 %, se secaron a la temperatura de 30 ~ 37 °C y se molieron en un polvo por una mezcladora. Las células viables pulverizadas se contaron hasta un valor deseado, se mezclaron con una cantidad adecuada de excipientes tales como glucosa, lactosa y leche desnatada y se envasaron en una bolsita de aluminio sellable.

El medio de cultivo o la composición de bacterias fabricado de acuerdo con lo anterior se añadió en una cantidad de un 0,001 % ~ 3 % basándose en el peso total del Kimchi en la fabricación de Kimchi. El Kimchi se fermentó y maduró de acuerdo con el procedimiento de fabricación de CJ Cheiljedang. Además, se realizó un ensayo sensitivo y análisis fisicoquímicos con dos (2) tipos de Kimchi preparado de las mismas materias primas y relación de composición, uno de los cuales se fermentó con un iniciador *Leuconostoc citreum* CJGN34 y el otro de los cuales se fermentó de forma natural sin un iniciador. Como el resultado puede ser diferente dependiendo de la maduración, la maduración se ajustó dentro de un intervalo de un 0 a un 0,05 % basado en la acidez total. El resultado del ensayo sensitivo para el Kimchi fabricado anteriormente se muestra en la tabla 4.

Tabla 4.

| estación de fabricación | muestra | Preferencia de sabor general | Preferencia de acidez | Preferencia de sabor carbonatado | Preferencia de regusto |
|-------------------------|------------------------------------|------------------------------|-----------------------|----------------------------------|------------------------|
| Verano | Kimchi fermentado de forma natural | 3,59 | 3,22 | 3,49 | 3,36 |
| Verano | Kimchi iniciador | 3,85 | 3,67 | 3,61 | 3,81 |

(continuación)

| estación de fabricación | muestra | Preferencia de sabor general | Preferencia de acidez | Preferencia de sabor carbonatado | Preferencia de regusto |
|-------------------------|------------------------------------|------------------------------|-----------------------|----------------------------------|------------------------|
| Invierno | Kimchi fermentado de forma natural | 4,01 | 3,81 | 3,71 | 3,76 |
| Invierno | Kimchi iniciador | 4,05 | 3,92 | 3,82 | 3,79 |
| Primavera | Kimchi fermentado de forma natural | 3,81 | 3,66 | 3,68 | 3,68 |
| Primavera | Kimchi iniciador | 3,91 | 3,71 | 3,75 | 3,72 |
| Otoño | Kimchi fermentado de forma natural | 3,86 | 3,72 | 3,66 | 3,71 |
| Otoño | Kimchi iniciador | 3,89 | 3,78 | 3,71 | 3,7 |

5 Como se muestra a partir de la tabla 4, la preferencia de sabor general para el Kimchi fermentado de forma natural muestra una amplia desviación dependiendo de la estación de fabricación, es decir, un valor de 3,59 para el Kimchi de verano hasta un valor de 4,01 para el Kimchi de invierno. Por otro lado, el Kimchi fabricado con un iniciador *Leuconostoc citreum* CJGN34 muestra una desviación más estrecha de la calidad del sabor, es decir, un valor de 3,85 para el Kimchi de verano hasta un valor de 4,05 para el Kimchi de invierno, lo que significa que *Leuconostoc citreum* CJGN34 tiene un efecto significativo en proporcionar Kimchi con una calidad de fermentación constante durante todo el año. Especialmente, el Kimchi de verano fermentado de forma natural muestra valores inferiores para la preferencia de acidez, la preferencia de sabor carbonatado y la preferencia de regusto con un valor inferior de aproximadamente 3,5 para una preferencia de sabor general. Sin embargo, el Kimchi iniciador tiene una variación de preferencia de acidez y preferencia de regusto dentro de un 95 % de significancia, una variación de preferencia de sabor carbonatado dentro un 90 % de significancia y una variación de preferencia de sabor general dentro de un 95 % de significancia, lo que significa que el deterioro de la calidad de fermentación del Kimchi de verano se inhibía de forma eficaz.

20 La relación molar de ácido láctico a ácido acético, que es una observación principal que muestra el tipo de fermentación entre la heterofermentación y la homofermentación muestra que el Kimchi iniciador de verano tiene un valor inferior en comparación con el Kimchi de verano fermentado de forma natural. Dicho resultado indica que el iniciador *Leuconostoc citreum* CJGN34 normalmente dominaba, inhibía las bacterias acidolácticas de homofermentación o heterofermentación y controlaba de forma eficaz el deterioro de la calidad de fermentación del Kimchi.

El resultado del análisis de los ácidos orgánicos del Kimchi fabricado en cada estación se muestra en la siguiente tabla 5.

Tabla 5.

| estación de fabricación | muestra | Relación de concentración de ácido láctico/ácido acético (mM) |
|-------------------------|------------------------------------|---|
| verano | Kimchi fermentado de forma natural | 2,4±0,3 |
| verano | Kimchi iniciador | 1,5 ±0,1 |
| invierno | Kimchi fermentado de forma natural | 1,4 ±0,2 |
| Invierno | Kimchi iniciador | 1,3 ±0,3 |
| primavera | Kimchi fermentado de forma natural | 1,5 ±0,1 |
| primavera | Kimchi iniciador | 1,5 ±0,1 |
| otoño | Kimchi fermentado de forma natural | 1,4 ±0,1 |
| otoño | Kimchi iniciador | 1,4±0,1 |

25

Ejemplo 5: Alimentos fermentados y salmueras fabricadas usando la bacteria *Leuconostoc citreum* CJGN34 como iniciador

5 Para aplicar la bacteria *Leuconostoc citreum* CJGN34 de acuerdo con la presente invención a alimentos de fermentación además de Kimchi como iniciador, se preparó un cultivo bacteriano o una composición de bacterias de la misma manera que en el ejemplo 4 y se usó como iniciador en la fabricación de alimentos fermentados. Los alimentos fermentados se prepararon de diversas materias primas tales como pepino, rábano, zanahoria, cebolla, ajo, pimienta y col coreana. Además, se fabricaron rábanos seleccionados fermentados aplicando el iniciador a rábanos seleccionados.

Ejemplo 6: Preparación y uso de una composición de bacterias que contiene *Leuconostoc citreum* CJGN34

10 Se produjo en masa *Leuconostoc citreum* CJGN34 identificada en el ejemplo 1 y se preparó una composición de bacterias de acuerdo con el ejemplo 4 como materiales de medicación, alimentos, piensos, aditivos alimenticios o cosméticos.

15 La composición de bacterias preparada se usó como probiótico alimenticio después de mezclarse con materiales alimenticios tales como cereales en polvo; como medicaciones o probióticos alimenticios en forma de comprimidos o cápsulas después de mezclarse con vehículos o aditivos; o como materiales cosméticos después de mezclarse con los otros materiales cosméticos. La composición de bacterias podía utilizarse en diversas industrias de acuerdo con los procedimientos convencionales de la técnica.

REIVINDICACIONES

1. *Leuconostoc citreum* CJGN34 KCTC 10974BP.
2. Una composición que contiene *Leuconostoc citreum* CJGN34 de la reivindicación 1 como un ingrediente eficaz, en la que la composición es
 - 5 (a) una composición iniciadora para fermentar alimentos;
 - (b) una composición farmacéutica de bacterias acidolácticas; o
 - (c) una composición alimenticia de bacterias acidolácticas.
3. Un alimento fermentado fabricado por el uso de la composición iniciadora para fermentar alimentos en la reivindicación 2.
- 10 4. El alimento fermentado de la reivindicación 3, que es un alimento en salmuera.
5. El alimento fermentado de la reivindicación 3, que es Kimchi.
6. Uso de una composición iniciadora para fermentar alimentos de acuerdo con la reivindicación 2 para fabricar un alimento fermentado.
7. El uso de la reivindicación 6, en el que el alimento fermentado es un alimento en salmuera.
- 15 8. El uso de la reivindicación 6, en el que el alimento fermentado es Kimchi.
9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el alimento fermentado se fabrica en verano.
10. Uso de *Leuconostoc citreum* CJGN34 de la reivindicación 1 para inhibir el deterioro de una composición de acuerdo con la reivindicación 2 o de un alimento fermentado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5.

20

Fig. 1

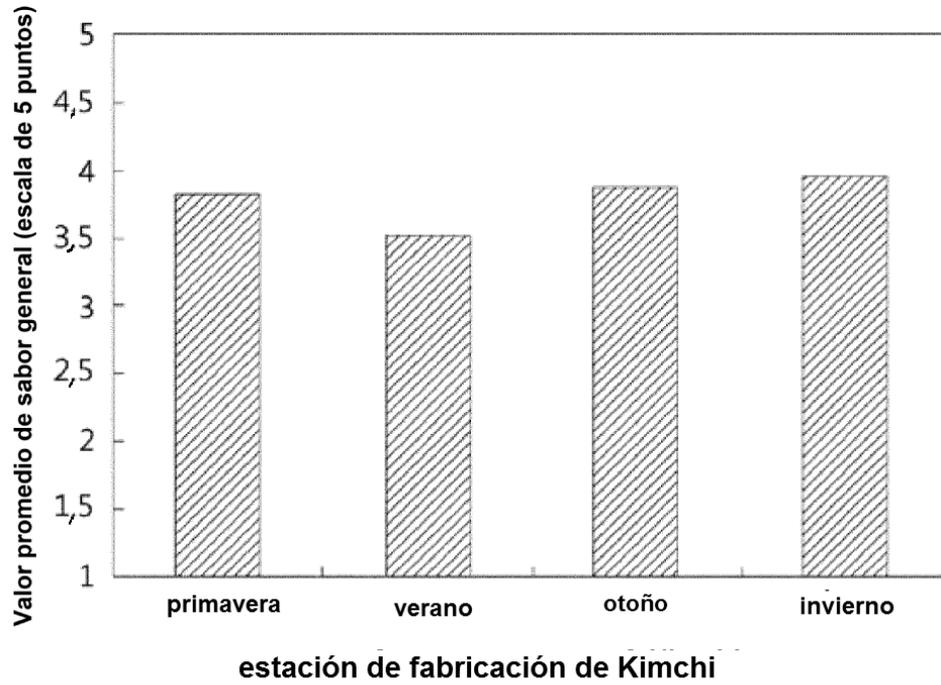


Fig. 2

