

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 435**

51 Int. Cl.:

A23L 3/3571 (2006.01)

C12R 1/24 (2006.01)

A23C 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2013 E 13159061 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2777405**

54 Título: **Nuevas cepas de Lactobacillus y sus usos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.04.2019

73 Titular/es:
NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es:
LANG, CHRISTINE;
HEILMANN, ANDREAS y
GOELLING, DETLEF

74 Agente/Representante:
TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 710 435 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

Nuevas cepas de *Lactobacillus* y sus usos

Campo de la invención

5 [0001] La invención se refiere a nuevas cepas de *Lactobacillus* y sus usos, en particular para conservar alimentos, alimentos para animales, composiciones farmacéuticas y/o composiciones cosméticas.

Estado de la técnica y antecedentes de la invención

10 [0002] Los alimentos y los alimentos para animales son, debido a su composición nutritiva, buenos sustratos para los microorganismos. Consideraciones similares se aplican a las composiciones farmacéuticas y cosméticas debido a las sustancias galénicas o las sustancias de soporte y auxiliares a menudo contenidas en las mismas. Muchos de estos microorganismos, en particular los hongos, son una de las razones más frecuentes para el deterioro de alimentos y alimentos para animales, pero también de composiciones farmacéuticas o cosméticas. Particularmente críticas son en especial las micotoxinas tóxicas y cancerígenas formadas por los microorganismos, que son peligrosas para la salud de los seres humanos. Además de este efecto, el deterioro de los alimentos tiene un impacto económico enorme cada año. Se asume que aprox. un 5-10 % de los alimentos se destruye cada año debido al deterioro microbiano.

[0003] Para evitar el deterioro de, por ejemplo, alimentos y alimentos para animales, se hacen más duraderos mediante el procesado o la adición de conservantes químicos o biológicos. La demanda de conservantes biológicos en particular está en aumento, ya que muchos consumidores buscan evitar los conservantes químicos.

20 [0004] A estos conservantes biológicos pertenecen, por ejemplo, las bacterias lácticas. Estas bacterias son normalmente inocuas para el ser humano y se han usado históricamente durante siglos en la conservación de los alimentos. Su seguridad e inocuidad se expresa en su denominado estado GRAS (reconocido generalmente como seguro) de la FDA estadounidense (Food and Drug Administration). Además, en muchos alimentos, las bacterias lácticas ya ocurren de manera natural.

25 [0005] El mecanismo de bioconservación puede estar causado por crecimiento competitivo o por la biosíntesis de metabolitos antagonistas y antimicrobianos. Principalmente, el efecto conservante de las bacterias lácticas se debe a la generación de ácidos orgánicos tal como el ácido láctico. Así, se reduce el valor del pH, que inhibe el crecimiento de muchos microorganismos.

30 [0006] Además del ácido láctico, hay una serie de otros metabolitos, tales como el ácido acético, el peróxido de hidrógeno, el diacetilo, la reuterina y las denominadas bacteriocinas, que son importantes para la conservación de los alimentos y los alimentos para animales.

35 [0007] Algunos de estos metabolitos, tales como el ácido láctico y la reuterina, inhiben el crecimiento de las bacterias y los hongos, otras sustancias, tales como las bacteriocinas, inhiben exclusivamente el crecimiento de las bacterias, y de nuevo otras sustancias actúan solo contra los hongos. En estudios sobre la actividad antifúngica de bacterias lácticas, se pudieron identificar numerosas sustancias inhibitoras: ácido caproico, propiónico, butírico, acético, fórmico y valerianico (Corsetti, A.G., Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1, Applied Microbiology and Biotechnology (50), págs. 253-256, (1998)), metilhidantoína y mevalonolactona (Niku-Paavola, M.L., New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*, Journal of Applied Microbiology (86), págs. 29-35; (1999), varios ácidos grasos hidroxilados (Sjogren, J.M., Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14, Applied and Environmental Microbiology (69), págs. 7554-7557, (2003)), ácido 3-fenil-láctico (Lavermicocca, P.V., Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B, Applied and Environmental Microbiology (66), págs. 4084-90; (2000), y dicetopiperazinas (Niku-Paavola, véase arriba). No obstante, algunos componentes proteínogénicos con actividad antifúngica no se pudieron identificar (Magnusson, J., *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound, Applied and Environmental Microbiology (67), págs. 1-5, (2001)).

40 [0008] Mientras que muchos de los metabolitos se forman acompañando el crecimiento celular de las bacterias lácticas, se sabe que otros se generan solo después de una inducción. Este mecanismo se denomina generalmente autoinducción o "detección de quórum". Este efecto se conoce ya para algunas bacteriocinas, tales como *Carnobacterium piscicola* (Kleerebezem, M.K., A two-component signal transduction cascade in *Carnobacterium piscicola* LV17B: two signaling peptides and one sensor-transmitter, Peptides (22), págs. 1597-

1601, (2003)), *Lactobacillus sakei* (Diep, D.B., The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a three-component regulatory system, Microbiology (146), págs. 2155-2160, (2000)), *Lactobacillus plantarum* (Maldonado, A.J.-D., Induction of Plantaricin Production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after Coculture with Specific Gram-Positive Bacteria Is Mediated by an Autoinduction Mechanism, J. Bacteriol., 5 (186), págs. 1556-1564 (2003)) y *Enterococcus faecium* (Nilsen, T.I., An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC 492, J. Bacteriol. (180), págs. 1848-1854, (1998)).

[0009] Sin embargo, las bacterias de las especies *Burkholderia* y *Pseudomonas* no tienen el estado GRAS y, por lo tanto, no son adecuadas para uso en alimentos o alimentos para animales.

10 [0010] Patra Falguni et al. ("Productions of proteinaceous antifungal substances from *Lactobacillus brevis* NDCD 02", International Journal of Dairy Technology vol. 63, n.º 1, 1 febrero 2010, páginas 70-76), divulga una cepa de *Lactobacillus brevis* con un amplio espectro antifúngico, que se puede usar en los alimentos como un bioconservante y como BL no iniciadora. La cepa de *Lactobacillus brevis* necesita medio rico en nutrientes para producir sustancias antifúngicas.

15 [0011] EP 2543246 divulga el efecto antifúngico de bacterias viables de la cepa de *Lactobacillus plantarum* contra *Penicillium* y *Aspergillus* en un recubrimiento de queso. EP 2592158 describe cepas aisladas de *Lactobacillus plantarum* con actividad antifúngica en zumos de frutas y productos lácteos fermentados.

[0012] Dados estos antecedentes, sería deseable proporcionar microorganismos reconocidos como GRAS, que formen metabolitos antifúngicos, inhiban el crecimiento de hongos y sean, por lo tanto, adecuados como conservantes.

Objetivo técnico de la invención

[0013] Por lo tanto, el objetivo técnico de la invención es proporcionar microorganismos que inhiben el crecimiento de hongos y son adecuados para usarse en alimentos, alimentos para animales, composiciones farmacéuticas y/o cosméticas.

25 Fundamentos de la invención y formas de realización preferidas

[0014] Para lograr este objetivo técnico, la invención enseña un microorganismo perteneciente al grupo de una bacteria láctica, registrada como *Lactobacillus brevis* DSM 22721, o un lisado de la misma para usar como aditivo alimentario, donde la bacteria láctica es heteroláctica y donde la bacteria láctica inhibe el crecimiento de al menos un organismo fúngico.

30 [0015] Las bacterias lácticas se dividen, desde un punto de vista taxonómico, en las subdivisiones de *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*. Se prefiere que el microorganismo de la presente invención sea una especie de *Lactobacillus*. Los miembros del grupo de las bacterias lácticas carecen normalmente de porfirinas y citocromos, no realizan fosforilación con transporte de electrones y, por lo tanto, obtienen energía solo por fosforilación a nivel de sustrato. Es decir, en bacterias lácticas, el ATP se sintetiza a través de la fermentación de carbohidratos. Todas las bacterias lácticas crecen anaeróticamente, sin embargo, a diferencia de muchos anaerobios, la mayoría de bacterias lácticas no son sensibles al oxígeno y por lo tanto pueden crecer en su presencia, así como en su ausencia. Por consiguiente, las bacterias de la presente invención son preferiblemente bacterias lácticas anaeróbicas aerotolerantes pertenecientes al género *Lactobacillus*.

40 [0016] Las bacterias lácticas de la presente invención tienen preferiblemente forma de bastón, y varían desde bastones largos y delgados hasta cortos y curvados, además son preferiblemente inmóviles y/o asporógenos. Se prefiere que las bacterias lácticas de la invención estén separadas o en pares. Producen preferiblemente ácido láctico como producto principal o único del metabolismo fermentativo. Se prefiere que las bacterias lácticas de la invención produzcan ácido láctico, preferiblemente el isómero DL del ácido láctico en una cantidad de al menos un 50% de glucosa a través de la vía de las pentosas fosfato. Las bacterias lácticas de la invención pueden producir también dióxido de carbono y etanol. Se prefiere que las bacterias lácticas muestren crecimiento variable a una temperatura de 15°C o 45°C. Además, se prefiere que tengan ácido teicoico de glicerol en su pared celular.

50 [0017] En base a las características descritas anteriormente, las bacterias lácticas de la presente invención se pueden clasificar como pertenecientes al género *Lactobacillus*. Usando la sistemática tradicional, por ejemplo, en referencia a las descripciones pertinentes en "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (Williams & Wilkins Co., 1984), una bacteria láctica de la presente invención se puede determinar que pertenece al género *Lactobacillus*. Alternativamente, las bacterias lácticas de la presente invención se pueden clasificar como

pertenecientes al género *Lactobacillus* por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por su huella metabólica, es decir, una visión general comparable de la capacidad del microorganismo o los microorganismos de la presente invención para metabolizar azúcares o por otros métodos descritos, por ejemplo, en Schleifer et al., System. Appl. Microb., 18 (1995), 461-467 o Ludwig et al., System. Appl. Microb., 15 (1992), 487-501. Los microorganismos de la presente invención son capaces de metabolizar fuentes de azúcar que son típicas y conocidas en la técnica para microorganismos pertenecientes al género *Lactobacillus*. En una forma de realización preferida, sin embargo, la bacteria láctica de la presente invención tiene una huella metabólica seleccionada del grupo que consiste en:

(i) metaboliza D-lactosa, pero no L-sorbosa y/o D-sacarosa y/o D-inulina,

(ii) metaboliza inulina,

(iii) metaboliza L-sorbosa, pero no D-lactosa y/o D-sacarosa y/o inulina, y

(iv) metaboliza L-sorbosa, D-lactosa e inulina.

[0018] Preferiblemente, la bacteria láctica de la presente invención tiene una huella metabólica seleccionada del grupo que consiste en:

(i) metaboliza D-lactosa, pero no L-sorbosa, D-sacarosa e inulina,

(ii) metaboliza L-sorbosa, D-lactosa e inulina, pero no D-sacarosa,

(iii) metaboliza L-sorbosa, pero no D-lactosa, D-sacarosa e inulina, y

(iv) metaboliza L-sorbosa, D-lactosa, D-sacarosa, pero no inulina.

[0019] Por supuesto, la bacteria láctica de la presente invención no está limitada a la metabolización de los azúcares mencionados en el patrón de huella metabólica anteriormente mencionado, sino que puede ser capaz de metabolizar azúcares adicionales que son metabolizados comúnmente por especies de *Lactobacillus*.

[0020] La afiliación de los microorganismos de la presente invención al género *Lactobacillus* puede caracterizarse también por el uso de otros métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando electroforesis en gel SDS-PAGE de la proteína total de las especies que se van a determinar y comparándolas con cepas conocidas y ya caracterizadas del género *Lactobacillus*. Una persona experta en la técnica conoce bien las técnicas para preparar un perfil de proteína total como se ha descrito anteriormente, así como el análisis numérico de tales perfiles. Sin embargo, los resultados son solo fiables en la medida en que cada fase del proceso está suficientemente estandarizada. Frente al requisito de precisión cuando se determina la adhesión de un microorganismo al género *Lactobacillus*, los autores ponen regularmente a disposición del público procedimientos estandarizados como el de Pot et al., presentado durante un "taller" organizado por la Unión Europea, en la universidad de Gante, en Bélgica, del 12 al 16 de septiembre de 1994 (Fingerprinting techniques for classification and identification of bacteria, SDS-PAGE of whole cell protein). El *software* usado en la técnica para el análisis del gel de electroforesis SDS-PAGE es de vital importancia, ya que el grado de correlación entre las especies depende de los parámetros y algoritmos usados por este *software*. Sin entrar en los detalles teóricos, la comparación cuantitativa de las bandas medidas por un densitómetro y normalizadas por un ordenador se hace preferiblemente con el coeficiente de correlación de Pearson. La matriz de similitud así obtenida se puede organizar con la ayuda del algoritmo UPGMA (método de ligamiento promedio no ponderado de grupos de pares) que no solo hace posible agrupar los perfiles más similares, sino también construir dendogramas (véase Kersters, Numerical methods in the classification and identification of bacteria by electrophoresis, in Computer-assisted Bacterial Systematics, 337-368, M. Goodfellow, A. G. O'Donnell Ed., John Wiley and Sons Ltd, 1985).

[0021] Alternativamente, la afiliación de dichos microorganismos de la presente invención al género *Lactobacillus* se puede caracterizar con respecto al ARN ribosómico en una así denominada Riboprinter®. Más preferiblemente, la afiliación de las especies recién identificadas de la invención al género *Lactobacillus* se demuestra comparando la secuencia de nucleótidos del ARN ribosómico 16S de las bacterias de la invención, o de su ADN genómico que codifica el ARN ribosómico 16S, con los de otros géneros y especies de bacterias lácticas conocidas hasta la fecha. Otra alternativa preferida para determinar la adhesión de las especies recién identificadas de la invención al género *Lactobacillus* es el uso de cebadores de PCR específicos de especie que se dirigen a la región espaciadora del ARNr 16S-23S. Otra alternativa preferida es la RAPD-PCR (Nigatu et al. en Antonie van Leeuwenhoek (79); 1-6, 2001) en virtud de que se genera un patrón de ADN específico de la cepa que permite determinar la afiliación de unos microorganismos identificados conforme a la presente invención al

género *Lactobacillus*. Otras técnicas útiles para determinar la afiliación del microorganismo de la presente invención al género *Lactobacillus* son los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) (Giraffa et al., Int. J. Food Microbiol. 82 (2003); 163-172), la identificación genética de los elementos repetitivos (Gevers et al., FEMS Microbiol. Lett. 205 (2001) 31-36) o el análisis del patrón de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) de células bacterianas (Heyrman et al., FEMS Microbiol. Lett. 181 (1991), 55- 62). Alternativamente, los lactobacilos se pueden determinar mediante tipificación de lectina (Annuk et al., J. Med. Microbiol. 50 (2001) 1069-1074) o por análisis de las proteínas de su pared celular (Gatti et al., Lett. Appl. Microbiol. 25 (1997), 345-348).

10 [0022] También se prefiere que la bacteria láctica de la invención se caracterice porque se puede analizar según los pasos siguientes:

- a) se establece un sustrato,
- b) se establece una preparación que comprende las bacterias lácticas bajo investigación,
- c) la preparación que comprende las bacterias lácticas se añade al sustrato, opcionalmente seguido de un paso de fermentación,
- 15 d) el producto del paso c) se muestrea en soportes de muestra, aquí se forman las muestras de ensayo,
- e) un número predeterminado de esporas fúngicas se añade a al menos una muestra de ensayo,
- f) la incubación de la muestra de ensayo obtenida en el paso d) se realiza durante una duración predeterminada a una temperatura predeterminada,
- g) detección, opcionalmente seguida de la evaluación del crecimiento fúngico.

20 [0023] Se prefiere que el crecimiento fúngico se detecte realizando un disparo de cámara o mediante inspección visual de la muestra de ensayo después del paso f) y evaluación del crecimiento fúngico.

[0024] Si no es detectable ningún crecimiento fúngico, la bacteria láctica es una bacteria láctica según la invención. Además, si se detecta crecimiento fúngico reducido, comparado con una muestra de ensayo de control, donde se ha omitido el paso c), entonces la bacteria láctica es también una especie según la invención. Aquí, la expresión "reducido" significa una reducción del crecimiento fúngico de al menos un 20%, mejor al menos un 50%, preferiblemente al menos un 90%. La cuantificación se puede llevar a cabo realizando el disparo de una cámara con un ajuste de contraste definido y el recuento automatizado de los píxeles relativos a la cobertura fúngica, donde el recuento de píxeles relativos a la cobertura fúngica se refiere al número de píxeles total del disparo de la cámara de la muestra de ensayo. El disparo de la cámara será preferiblemente en negro/blanco. En algunos casos será de ayuda teñir el sustrato con un pigmento o color oscuro (que es preferiblemente inerte microbiológicamente) para aumentar el contraste de los hongos sobre el sustrato, por ejemplo, si el sustrato es un sustrato de yogur de color blanco y los hongos muestran también color blanco. En particular, el ensayo se puede realizar como se describe en el ejemplo 1.2, último párrafo. Como cámara, es útil el sistema FluorChem® FC2 Imaging System (Alpha Innotech/Cell Biosciences, Santa Clara, EE.UU.) con los ajustes siguientes: tiempo de exposición: 100 - 150 ms, abertura: 8, ajustes de contraste: nivel de negro: 55000, nivel de blanco: 60000, gamma: 3.0, ajustes de luz: trans-luz "on", luz reflejada "on", chemi display "on", velocidad/resolución: normal/ultra. Las imágenes se analizaron con el *software* AlphaEaseFC.

40 [0025] Como una muestra de ensayo de control alternativa o adicional, se puede usar una muestra de ensayo, donde se emplea sorbato de potasio en una cantidad predeterminada habitual en la técnica de conservación de alimentos (por ejemplo, 0,2 mg por gramo) en el paso c) en vez del paso c) anteriormente descrito. Esta muestra de ensayo de control puede servir entonces como valor de referencia, es decir, las bacterias lácticas de la invención efectúan una inhibición del crecimiento fúngico al menos en la misma cantidad que esta muestra de ensayo de control.

45 [0026] Las células son viables, si cumplen con el ensayo de viabilidad de la DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania, si es aplicable en cocultivo con el respectivo sustrato al que las células se deben añadir o sobre el que deben aplicarse.

[0027] Se prefiere que la bacteria láctica sea una bacteria láctica viva.

[0028] Se prefiere especialmente que la bacteria láctica sea *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus fructivorans*.

[0029] Conforme a la presente invención, los microorganismos son bacterias lácticas del género *Lactobacillus*, más preferiblemente especies de *Lactobacillus* como se describe aquí. Aún más preferiblemente, el *Lactobacillus* de la presente invención es *Lactobacillus brevis*; otro *Lactobacillus* preferido es *L. parafarraginis*. Sin embargo, las especies de *Lactobacillus* no se limitan a las mismas. En una forma de realización preferida particular los microorganismos de la presente invención están "aislados" o "purificados". El término "aislado" significa que el material se elimina de su entorno original, por ejemplo, el entorno natural si es de origen natural. Por ejemplo, se aísla un microorganismo natural, preferiblemente una especie de *Lactobacillus*, separado de algún o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Tal microorganismo podría ser parte de una composición, y debe considerarse todavía que está aislado porque la composición no es parte de su entorno natural.

[0030] El término "purificado" no requiere pureza absoluta; más bien, se pretende como una definición relativa. Los microorganismos individuales obtenidos a partir de una biblioteca se han purificado convencionalmente hasta la homogeneidad microbiológica, es decir, crecen como colonias individuales cuando se extienden en placas de agar por métodos conocidos en la técnica. Preferiblemente, las placas de agar que se usan para este fin son selectivas para especies de *Lactobacillus*. Tales placas de agar selectivas se conocen en la técnica.

[0031] Se prefiere especialmente que la bacteria láctica sea una bacteria láctica registrada como DSM 22721 o un lisado de la misma, donde dicho lisado retiene la capacidad de inhibir el crecimiento de un organismo fúngico.

[0032] En una forma de realización particularmente preferida de la presente invención, las bacterias lácticas de la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en el *Lactobacillus brevis* con el número de registro de DSMZ DSM 22721 o un lisado del mismo, donde dicho mutante o derivado retiene la capacidad de inhibir el crecimiento de organismos fúngicos. El término "*Lactobacillus brevis* que tiene el número de registro de DSMZ" se refiere a células de un microorganismo pertenecientes a la especie *Lactobacillus brevis* depositada en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ("DSMZ") el 26 de junio de 2009 y que tiene el siguiente número de depósito DSM 22721. La DSMZ está ubicada en Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania. Los depósitos DSMZ anteriormente mencionados se hicieron conforme a los términos del tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos con fines del procedimiento de patentes.

[0033] "Un mutante o derivado" de las bacterias lácticas de la presente invención, preferiblemente del *Lactobacillus brevis* depositado tiene preferiblemente las mismas características que la cepa respectiva depositada, es decir, retiene la capacidad de inhibir el crecimiento de organismos fúngicos, preferiblemente con las características de inhibición descritas anteriormente. Por ejemplo, dicho derivado puede ser genéticamente modificado. En el contexto de la presente invención, el término "genéticamente modificado" se usa en su sentido más amplio para métodos conocidos por la persona experta en la técnica para modificar ácidos nucleicos deseados *in vitro* e *in vivo* de manera que se vean afectadas modificaciones genéticas y se alteren los genes mediante tecnología de ADN recombinante. Por consiguiente, se prefiere que dichos métodos comprendan clonación, secuenciación y transformación de ácidos nucleicos recombinantes. Para este fin, vectores apropiados, incluyendo vectores de expresión para especies de *Lactobacillus* como, por ejemplo, los descritos en EP-B1 506 789, EP-B1 316 677, EP-B1 251 064, EP-B1-218 230, EP-B1 133 046 o WO 89/01970.

[0034] Cuando se usa en el contexto de la presente invención, el término "bacterias lácticas de la presente invención" abarca también lisados, tal como una fracción de membrana como se describe aquí, de dicho(s) microorganismo(s) que retienen la capacidad descrita anteriormente de inhibir el crecimiento de un organismo fúngico.

[0035] *Lactobacillus brevis* con el número de registro de DSMZ DSM 22721 o un mutante o derivado del mismo se caracterizan por las especificaciones siguientes. Los organismos muestran un crecimiento óptimo a de 30°C a 37°C bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas. No se puede detectar ningún crecimiento por encima de 42°C.

[0036] La fermentación aeróbica de *Lactobacillus brevis* con el número de registro de DSMZ DSM 22721 o un mutante o derivado del mismo resulta en una densidad de células más alta.

[0037] El cultivo de *Lactobacillus brevis* con el número de registro de DSMZ DSM 22721 o un mutante o derivado del mismo bajo condiciones estándares (por ejemplo, medio MRS, 37°C, anaeróbico) resulta en una acidificación con pH 3,5-3,7.

[0038] *Lactobacillus brevis* con el número de registro de DSMZ DSM 22721 o un mutante o derivado del mismo están presentes como bastones separados o como pares o, raramente, como cadenas cortas (2-10 µm). Bajo condiciones estándares tienden a formar colonias de color blanco a crema con un aspecto ligeramente mate y una superficie ligeramente estructurada.

- 5 [0039] Sorprendentemente, la adición de las bacterias lácticas de la invención, con preferencia *Lactobacillus brevis* con el número de registro de DSMZ DSM 22721 o un mutante o derivado del mismo, no cambia la textura o el color de los productos alimentarios, especialmente yogur.

- 10 [0040] Se prefiere que las bacterias lácticas de la invención, preferiblemente *Lactobacillus brevis* con el número de registro de DSMZ DSM 22721 o un mutante o derivado del mismo, comprendan rADN 16S con la siguiente secuencia 1 (SEC ID No.1):

GCGACTTTTCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAGGTCTGAT
 GTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGGGCATCGGAAACCGGGAGACTTGAGTG
 CAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAG
 AACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAG
 CATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTG
 CTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC
 GCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA
 CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCT
 TGACATCTTCTGCTAACCTAAGAGATTAGGCGTTCCCTTCGGGGACGGAATGACAG
 GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC
 GAGCGCAACCCTTATTGTCAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTGGCGAGACTG
 CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGA
 CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAAACCGCGAGG
 TCAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGC
 ATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCC
 GGGCCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGCCCG
 TGAGGTAACCTTCGGGAACCAGCCGTCTAAGTGGGACAGATGATTAGGTGAAGTCG
 AC

- 15 [0041] Otra ventaja de las bacterias lácticas de la invención, con preferencia *Lactobacillus brevis* con el número de registro de DSMZ DSM 22721 o un mutante o derivado del mismo, es que es posible congelar la cepa durante al menos 6 meses a aproximadamente -20°C o aproximadamente -80°C. Las bacterias permanecen estables y no pierden su capacidad de inhibir el crecimiento de organismos fúngicos. También es posible almacenar las bacterias lácticas de la invención después de la liofilización (véase también la Fig. 2).

- 20 [0042] Una ventaja es que la bacteria láctica de la invención, especialmente la registrada como DSM 22721 o un lisado de la misma, inhibe el crecimiento de *Penicillium*, en particular *Penicillium commune* o *Penicillium roqueforti*, el género *Aspergillus* y el género *Alternaria*, en particular *Alternaria alternata*, *Penicillium expansum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Eurotium herbariorum*, *Geotrichum candidum*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium sambucinum*, *Phytophthora infestans* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

- 25 [0043] En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al uso de dichas bacterias lácticas o un lisado de las mismas para la producción de una composición alimentaria, alimento para animales o una composición farmacéutica o cosmética, donde las bacterias lácticas, con preferencia bacterias lácticas vivas, o un lisado de las mismas se añaden al alimento, a alimento para animales o a una composición farmacéutica o cosmética.

- 5 [0044] Se sabe comúnmente que *Lactobacillus brevis* usa un metabolismo heterofermentativo y, por lo tanto, es heteroláctico. El metabolismo heterofermentativo se caracteriza normalmente por la producción de gas y ácido. Ambos efectos son adversos para la producción de alimentos, fármacos o cosméticos. Fue, por lo tanto, muy sorprendente que las bacterias lácticas de la invención, especialmente *Lactobacillus brevis* con el número de registro de DSMZ DSM 22721 o un mutante o derivado del mismo, muestran características homofermentativas cuando se cultivan en composiciones cosméticas o farmacéuticas o alimentos, por ejemplo, productos lácteos, preferiblemente yogur.
- 10 [0045] La preparación galénica de una composición farmacéutica según la invención se puede hacer de una manera habitual en esta tecnología. Son formas adecuadas de preparaciones galénicas sólidas o líquidas, por ejemplo, granulados, polvos, grageas, comprimidos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, zumos, suspensiones o emulsiones, para la producción de las cuales se usan medios habituales, tales como sustancias portadoras, explosivos, agentes aglutinantes, de recubrimiento, de hinchamiento, deslizantes o lubricantes, saborizantes, edulcorantes y mediadores de soluciones. Como sustancias auxiliares se nombran aquí carbonato de magnesio, dióxido de titanio, lactosa, manita y otros azúcares, talco, proteína de la leche, gelatina, almidón, celulosa y derivados, aceites animales y vegetales, tales como aceite de hígado de bacalao, aceite de girasol, aceite de cacahuete o aceite de sésamo, polietilenglicoles y solventes, tales como agua esterilizada y alcoholes mono o multivalentes, por ejemplo, glicerina. Una composición farmacéutica según la invención se puede producir mezclando bacterias lácticas según la invención en una dosis definida con un portador farmacéuticamente adecuado y fisiológicamente bien tolerado y, posiblemente, otras sustancias activas adecuadas adicionales o auxiliares, y se prepara en la forma deseada de administración. Los portadores son en particular sustancias que se seleccionan del grupo que comprende "maltodextrina, celulosa microcristalina, almidón, en particular almidón de maíz, levulosa, lactosa, dextrosa y mezclas de tales sustancias". La composición puede contener de un 0,1 a un 95% en peso de portador y de un 5 a un 99,9% en peso de bacterias lácticas liofilizadas, con respecto a la cantidad total de células y portadores, o consistir en las mismas.
- 25 [0046] *Lactobacillus brevis* con el número de registro de DSMZ DSM 22721 o un mutante o derivado del mismo son heterofermentativos bajo condiciones estándares (por ejemplo, medio de fermentación o medio MRS bajo condiciones anaeróbicas). Esto significa que los organismos producen gas durante la fermentación si se cultivan bajo condiciones estándares.
- 30 [0047] Por lo tanto, fue muy sorprendente que *Lactobacillus brevis* con el número de registro de DSMZ DSM 22721 o un mutante o derivado del mismo presenten características homofermentativas cuando se cultivan en productos lácteos, preferiblemente yogur. Se produjo "yogur estándar" con iniciadores de fermentación estándares a 43°C, pH 4,5-4,7 y con leche desnatada enriquecida con leche desnatada en polvo. Después, el yogur se almacena a 7°C. Cuando se añadió al yogur *Lactobacillus brevis* con el número de registro de DSMZ DSM 22721 o un mutante o derivado del mismo, no se puede observar ninguna producción de gas (burbujas de gas o tapa convexa). Después de 30 días, el sabor extraño se midió mediante HPLC o análisis del espacio de cabeza. El efecto sorprendente de las características homofermentativas en productos lácteos tiene la ventaja de que no hay cambio en el sabor extraño del producto.
- 35 [0048] Otra característica de *Lactobacillus brevis* con el número de registro de DSMZ DSM 22721 o un mutante o derivado del mismo es que estos organismos no producen H₂O₂, ni en condición estándar (medio MRS) ni en condiciones de fermentación. Esto se evaluó con tiras reactivas de H₂O₂.
- 40 [0049] Otra ventaja es que la composición de ácidos orgánicos es muy estable en yogur con *Lactobacillus brevis* con el número de registro de DSMZ DSM 22721 o un mutante o derivado del mismo añadido. Casi no se observa ningún cambio del pH. Esto es especialmente importante para el uso en productos alimentarios.
- 45 [0050] *Lactobacillus brevis* con el número de registro de DSMZ DSM 22721 o un mutante o derivado del mismo muestran un crecimiento estático en yogur. Se produjo "yogur estándar" con iniciadores de fermentación estándares a 43°C, con leche desnatada enriquecida con leche desnatada en polvo y con un pH final de 4,5-4,7. Se añadió *Lactobacillus brevis* con el número de registro de DSMZ DSM 22721. El yogur producido se almacenó a 7°C durante 3 semanas. Después de estas 3 semanas no se observó ningún aumento de las bacterias de la invención.
- 50 [0051] Cuando se usa en composiciones farmacéuticas o cosméticas, se requiere, por supuesto, que la composición no contenga ninguna sustancia, en particular sustancias activas, que perjudique sustancialmente la viabilidad de las células y/o la actividad de células, compuestos, fragmentos o sobrenadantes de los mismos empleados según la invención. La persona experta en la técnica de las respectivas sustancias o sustancias activas puede determinar esto fácilmente con un ensayo de viabilidad, por ejemplo, como propone la DSMZ, se hace solo en cocultivo con la respectiva sustancia o sustancia activa a la concentración a la que está en la respectiva composición. Si este ensayo es positivo, las células según la invención pueden usarse con éxito. Si
- 55

esta prueba es negativa, se excluye la aplicación de la respectiva composición, ya que el efecto según la invención no se consigue o solo con un alcance reducido. Con respecto a la actividad, por ejemplo, es posible introducir la composición farmacéutica o cosmética en un ensayo para determinar la actividad de inhibición, como se ha descrito anteriormente, que caracteriza al microorganismo de la presente invención.

5 [0052] Las composiciones cosméticas son, por ejemplo, champú, crema hidratante, loción hidratante, crema glicólica, loción glicólica, limpiador, base de maquillaje de color, polvo de maquillaje de color o corrector de maquillaje de color.

10 [0053] Las bacterias lácticas de la invención se pueden usar como un producto de inoculación directa. Por lo tanto, las bacterias se pueden añadir a composiciones alimentarias, cosméticas o farmacéuticas sin ningún paso de procesamiento previo. Se prefiere que las bacterias de la invención se críoconserven en su propio sobrenadante de fermentación. Esto facilita la producción de los productos y, por lo tanto, contribuye a ahorrar tiempo y costes.

[0054] En otra forma de realización preferida, la invención se refiere a una composición alimentaria, que comprende un alimento y dichas bacterias lácticas o lisados de las mismas.

15 [0055] Se prefiere que la composición alimentaria, el alimento para animales, la composición farmacéutica o una composición cosmética contenga de 10^2 a 10^{15} , preferiblemente de 10^6 o 10^8 a 10^{12} , en particular de 10^8 a 10^{10} células de bacterias lácticas o lisados de las mismas, absolutas o referidas a 100 g del alimento, el alimento para animales o la composición farmacéutica que contiene las células. Estas cantidades son especialmente beneficiosas porque permiten una inhibición muy eficaz del crecimiento de hongos sin ningún efecto adverso.

[0056] Se prefiere que las bacterias lácticas estén presentes en una concentración del 0,0001% o más. Estas concentraciones son especialmente beneficiosas porque proporcionan una inhibición eficiente del crecimiento fúngico en productos alimentarios.

25 [0057] También se prefiere que la composición alimentaria sea un producto cárnico o un producto lácteo, preferiblemente yogur, leche, queso, crema y/o requesón. Estos productos son generalmente propensos al moho, que es por lo que el uso de las bacterias lácticas de la invención, preferiblemente *Lactobacillus brevis* con el número de registro de DSMZ DSM 22721 o un mutante o derivado del mismo, es especialmente beneficioso. Una ventaja adicional es que el efecto de inhibición del crecimiento fúngico no depende del tipo de cultivo iniciador y/o leche desnatada en polvo usados para la producción de productos lácteos, especialmente yogur. Por lo tanto, las bacterias lácticas de la invención se pueden usar en varios productos alimentarios sin perder el efecto beneficioso.

[0058] En otra forma de realización preferida, la invención se refiere a un método para conservar alimento, alimento para animales o una composición farmacéutica o cosmética, donde dichas bacterias lácticas se añaden al alimento, al alimento para animales o a la composición farmacéutica.

35 [0059] Para la conservación con bacterias lácticas según la invención, en principio se pueden usar todos los alimentos, alimentos para animales o composiciones farmacéuticas o cosméticas que puedan contener organismos fúngicos, bien por producción o bien por contaminación durante el almacenamiento.

40 [0060] Se prefiere que, por 100 g de alimento, alimento para animales o composición farmacéutica o cosmética, se añadan de 10^2 a 10^{15} , preferiblemente de 10^6 o 10^8 a 10^{12} , en particular de 10^8 a 10^{10} células de bacterias lácticas o lisados de las mismas.

45 [0061] También se prefiere que las bacterias lácticas se añadan en una concentración de 0,0001% a 0,01%, preferiblemente 0,001%. Estas concentraciones son especialmente beneficiosas porque proporcionan una inhibición eficiente del crecimiento fúngico en productos alimentarios. Mediante la adición de bacterias lácticas en una concentración de 0,0001% o más, preferiblemente 0,001%, el crecimiento fúngico se inhibe permanentemente de modo que el alimento, el alimento para animales o la composición farmacéutica o cosmética se pueda almacenar durante un largo periodo de tiempo sin perder la capacidad de evitar el crecimiento fúngico.

[0062] Especialmente se prefiere que se añada de un 0,0001% a un 0,01%, preferiblemente un 0,001%, de cultivo congelado granulado de los lactobacilos de la invención, preferiblemente a la fermentación de yogur. El uso de cultivo congelado granulado de lactobacilos es ventajoso para la producción industrial.

[0063] También se prefiere que 1 ml de cultivo congelado de lactobacilos contenga $0,5 \times 10^{10}$ UFC (unidades formadoras de colonias).

[0064] En otra forma de realización preferida, la invención se refiere a un método de identificación de dicha bacteria láctica que comprende:

- 5 a) proporcionar un sustrato,
- b) proporcionar una preparación que comprende las bacterias lácticas bajo investigación,
- c) adición de la preparación que comprende las bacterias lácticas al sustrato, opcionalmente seguido de un paso de fermentación,
- d) adición de un número predeterminado de esporas fúngicas al producto del paso c),
- 10 e) incubación de la muestra de ensayo obtenida en el paso d) durante una duración predeterminada a una temperatura predeterminada,
- f) detección, opcionalmente seguida de la evaluación del crecimiento fúngico.

[0065] Otro aspecto de la presente invención es un lisado de dicha bacteria láctica que está inactivado térmicamente o liofilizado, donde dicho lisado retiene la capacidad de inhibir el crecimiento del organismo fúngico. En particular, el lisado puede estar presente en un sobrenadante de un cultivo de los microorganismos de la invención o un fragmento de tal microorganismo. La capacidad se puede medir como se ha descrito anteriormente para caracterizar el microorganismo de la invención.

[0066] Como una alternativa adicional para caracterizar los microorganismos de la invención, es posible emplear los ensayos de biocontrol descritos en la referencia P. Raspor et al., Food Technol. Biotechnol. 48(3): 336-343 (2010), donde este ensayo se realiza usando los microorganismos bajo inspección y en comparación con experimentos de control en ausencia de un microorganismo y/o experimentos de control donde el microorganismo se reemplaza con un compuesto químico antimoho convencional a la concentración definida.

[0067] Se inhibe el crecimiento del organismo fúngico si, con el cultivo del organismo fúngico sin células según la invención, el crecimiento del organismo fúngico aumenta en al menos un 10%, preferiblemente en al menos un 50%, en comparación con un cocultivo del organismo fúngico con las células según la invención bajo condiciones idénticas de cultivo, medido como una densidad de asentamiento en un tiempo dado en un medio de cultivo para el organismo fúngico. Se hace referencia adicional al ensayo específico descrito anteriormente solo como un ejemplo.

[0068] Cebadores, enzimas, células huésped adicionales para la clonación de constructos intermedios y similares se pueden usar y se conocen por la persona experta en la materia. Preferiblemente, los mutantes genéticamente modificados comprenden células del microorganismo de la presente invención, preferiblemente de las especies de *Lactobacillus* depositadas que albergan ácidos nucleicos recombinantes comprendidos en su cromosoma bacteriano o un plásmido o plásmidos o comprendidos en su cromosoma bacteriano y/o un plásmido o plásmidos. Dichos ácidos nucleicos recombinantes son preferiblemente extraños al microorganismo de la presente invención. Por "extraño" se hace referencia a que el polinucleótido o molécula de ácido nucleico es o bien heteróloga con respecto a la célula huésped, esto quiere decir, derivada a partir de una célula u organismo con un fondo genómico diferente, o bien es homóloga respecto a la célula huésped, pero está situada en un entorno genómico diferente que el homólogo de origen natural de dicha molécula de ácido nucleico. Esto significa que, si la molécula de ácido nucleico es homóloga respecto a la célula huésped, no se sitúa en su ubicación natural en el genoma de dicha célula huésped, en particular está rodeada por genes diferentes. En este caso, el polinucleótido puede estar bajo el control de su propio promotor o bajo el control de un promotor heterólogo. El vector o molécula de ácido nucleico según la invención que está presente en la célula huésped puede o bien integrarse en el genoma de la célula huésped o bien puede mantenerse de alguna forma extracromosómicamente. A este respecto, también debe entenderse que la molécula de ácido nucleico de la invención se puede usar para restaurar o crear un gen mutante mediante recombinación homóloga.

[0069] Un mutante del microorganismo de la presente invención, preferiblemente un mutante de las cepas de *Lactobacillus* depositadas es mutado preferiblemente de manera artificial. Conforme a la presente invención, el término "mutado" significa una modificación permanente o unas modificaciones permanentes de material genético, es decir, ácidos nucleicos, causadas, por ejemplo, de manera natural o por medios físicos o compuestos/sustancias/agentes químicos, tales como EMS o ENU. Dichas modificaciones incluyen mutaciones

puntuales, como transiciones o transversiones, la delección/inserción/adición de una o más bases dentro de un ácido nucleico/gen/cromosoma, modificando así el ácido nucleico/gen/cromosoma que puede causar, entre otras cosas, la expresión/transcripción/traducción génica aberrante o productos génicos inactivos, productos génicos activos/inactivos constitutivos que conducen, por ejemplo, a efectos negativos dominantes. Preferiblemente, una mutación lleva a una mayor capacidad de inhibir el crecimiento de organismos fúngicos. Así, también se prefiere que las células mutantes del microorganismo depositado que albergan una mutación o mutaciones en un gen o genes deseado(s) o donde una mutación o mutaciones en un gen o genes deseado(s) se induzca(n) por métodos conocidos por la persona experta en la materia. También se conoce en el estado de la técnica que las células bacterianas mutadas o genéticamente modificadas se pueden seleccionar por cualquier método/fenotipo adecuado. En el contexto de la presente invención, un mutante que tiene una mayor capacidad de inhibir el crecimiento de organismos fúngicos se puede evaluar conforme a los métodos descritos en los ejemplos en la presente. El término "mutante", sin embargo, incluye también células del microorganismo de la presente invención, preferiblemente células del microorganismo depositado que albergan mutaciones naturales espontáneas en su genoma, es decir, cromosoma bacteriano. Las "mutaciones espontáneas" son mutaciones que surgen de manera natural, es decir, sin manipulación genética directa por el hombre, o por exposición a un mutágeno. La selección de mutantes espontáneos se puede realizar cultivando la cepa y seleccionando las variantes deseadas mediante, por ejemplo, la capacidad de la bacteria variante para mostrar un crecimiento mejorado. Métodos para la selección de mutantes espontáneos se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001); Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)). Por ejemplo, tales mutaciones pueden ocurrir durante el cultivo, por ejemplo, durante el proceso de división celular normal acoplado con la replicación de ADN o durante el pase y/o la preservación del mutante del microorganismo de la presente invención.

[0070] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un lisado del microorganismo de la presente invención, que está inactivado térmicamente o liofilizado, donde dicho análogo retiene la capacidad de inhibir el crecimiento de organismos fúngicos.

[0071] Según la presente invención, el término "análogo del microorganismo de la presente invención" incluye también una célula muerta o inactivada del microorganismo de la presente invención, preferiblemente de las especies de *Lactobacillus* descritas en la presente, que ya no es capaz de formar una colonia individual en una placa específica para microorganismos pertenecientes al género *Lactobacillus*. Dicha célula muerta o inactivada puede tener una membrana celular intacta o rota. Métodos para matar o inactivar células del microorganismo de la presente invención se conocen en la técnica. El-Nezami et al., J. Food Prot. 61 (1998), 466-468 describe un método para inactivar especies de *Lactobacillus* por irradiación de UV. Preferiblemente, las células del microorganismo de la presente invención están inactivadas térmicamente o liofilizadas. La liofilización de las células de la presente invención tiene la ventaja de que se pueden almacenar fácilmente y manejar mientras que retienen su capacidad de inhibir el crecimiento de organismos fúngicos. Además, las células liofilizadas se pueden cultivar de nuevo cuando se aplican, en condiciones conocidas en la técnica, a medios apropiados líquidos o sólidos. La liofilización se hace mediante métodos conocidos en la técnica. Preferiblemente, se realiza durante al menos 2 horas a temperatura ambiente, es decir, cualquier temperatura entre 16°C y 25°C. Además, las células liofilizadas del microorganismo de la presente invención son estables durante al menos 4 semanas a una temperatura de 4°C para inhibir todavía un organismo fúngico como se describe en la presente. La inactivación térmica se puede conseguir incubando las células del microorganismo de la presente invención durante al menos 2 horas a una temperatura de 170°C. Además, la inactivación térmica se consigue preferiblemente autoclavando dichas células a una temperatura de 121°C durante al menos 20 minutos en presencia de vapor saturado a una presión atmosférica de 2 bar. En la alternativa, la inactivación térmica de las células del microorganismo de la presente invención se consigue por congelación de dichas células durante al menos 4 semanas, 3 semanas, 2 semanas, 1 semana, 12 horas, 6 horas, 2 horas o 1 hora a -20°C. Se prefiere que al menos un 70%, un 75% o un 80%, más preferiblemente, un 85%, un 90% o un 95% y, particularmente preferido, al menos un 97%, un 98%, un 99% y, más particularmente preferido, un 99,1%, un 99,2%, un 99,3%, un 99,4%, un 99,5%, un 99,6%, un 99,7%, un 99,8% o un 99,9% y, de la manera más particularmente preferida, el 100% de las células del análogo del microorganismo de la presente invención estén muertas o inactivadas, sin embargo, tienen todavía la capacidad de inhibir el crecimiento de organismos fúngicos. Si el lisado del microorganismo de la presente invención está, de hecho, muerto o inactivado, se puede evaluar por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante un ensayo de viabilidad. El término "análogo del microorganismo de la presente invención" abarca lisados o fracciones del microorganismo de la presente invención, preferiblemente de las especies de *Lactobacillus* descritas en la presente. Según la presente invención, el término "lisado" significa una solución o suspensión en un medio acuoso de células del microorganismo de la presente invención que están rotas. El lisado celular comprende, por ejemplo, macromoléculas, como ADN, ARN, proteínas, péptidos, carbohidratos, lípidos y similares, y/o micromoléculas, como aminoácidos, azúcares, ácidos lipídicos y similares, o fracciones de las mismas. Adicionalmente, dicho lisado comprende restos celulares que pueden ser de estructura lisa o granular. Métodos para preparar lisados celulares de microorganismo se conocen en la técnica, por ejemplo, utilizando prensa francesa, trituración de células usando perlas de cristal o hierro o lisis celular enzimática y similares. Además, la lisis celular se refiere a varios métodos conocidos en la técnica para abrir/destruir células. El método

para lisar una célula no es importante y puede emplearse cualquier método que pueda conseguir la lisis de las células del microorganismo de la presente invención. La persona experta en la técnica puede elegir uno apropiado, por ejemplo, la abertura/destrucción de células se puede hacer enzimática, química o físicamente. Ejemplos no limitativos de enzimas y cócteles de enzimas son proteasas, como proteinasa K, lipasas o glicosidasas; ejemplos no limitativos de productos químicos son ionóforos, detergentes, como dodecilsulfato de sodio, ácidos o bases; y ejemplos no limitativos de medios físicos son alta presión, como la prensa francesa, osmolaridad, temperatura, como calor o frío. Además, también pueden utilizarse un método que utiliza una combinación apropiada de una enzima distinta de la enzima proteolítica, un ácido, una base y similares. Por ejemplo, las células del microorganismo de la presente invención se lisan congelando y descongelando, más preferiblemente congelando a temperaturas inferiores a -70°C y descongelando a temperaturas superiores a 30°C, particularmente, se prefiere congelar a temperaturas inferiores a -75°C y se prefiere descongelar a temperaturas superiores a 35°C y las más preferidas son temperaturas para congelar por debajo de -80°C y temperaturas para descongelar superiores a 37°C. También se prefiere que dicha congelación/descongelación se repita al menos 1 vez, más preferiblemente al menos 2 veces, aún más preferiblemente al menos 3 veces, se prefiere particularmente al menos 4 veces y, de la forma más preferida, al menos 5 veces.

[0072] Por consiguiente, las personas expertas en la técnica pueden preparar los lisados deseados refiriéndose a las explicaciones generales anteriores y modificando o alterando apropiadamente esos métodos, si es necesario. Preferiblemente, el medio acuoso usado para los lisados como se ha descrito es agua, solución salina fisiológica o una solución tampón. Una ventaja de un lisado de células bacterianas es que puede producirse fácilmente y almacenarse económicamente, ya que se necesitan instalaciones menos técnicas.

[0073] Según la invención, los lisados son también preparaciones de fracciones de moléculas de los lisados anteriormente mencionados. Estas fracciones se pueden obtener por métodos conocidos por aquellas personas expertas en la técnica, por ejemplo, cromatografía, incluyendo, por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de fase inversa y cromatografía con otro material cromatográfico en columna o métodos por lotes, otros métodos de fraccionamiento, por ejemplo, métodos de filtración, por ejemplo, ultrafiltración, diálisis, diálisis y concentración con exclusión por tamaño en centrifugación, centrifugación en gradientes de densidad o matrices de paso, precipitación, por ejemplo, precipitaciones de afinidad, solubilización por sales o precipitación por sales (precipitación con sulfato de amonio), precipitaciones alcohólicas u otros métodos proteicoquímicos, biológicos moleculares, bioquímicos, inmunológicos, químicos o físicos para separar los componentes anteriores de los lisados.

[0074] "Un fragmento del microorganismo de la presente invención" abarca cualquier parte de las células del microorganismo de la presente invención. Preferiblemente, dicho fragmento es una fracción de membrana obtenida mediante una preparación de membrana. Se pueden obtener preparaciones de membrana de microorganismos pertenecientes al género de *Lactobacillus* mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, empleando el método descrito en Rollan et al., Int. J. Food Microbiol. 70 (2001), 303-301, Matsuguchi et al., Clin. Diagn. Lab. Immunol. 10 (2003), 259-266 o Stentz et al., Appl. Environ. Microbiol. 66 (2000), 4272-4278 o Varmanen et al., J. Bacteriology 182 (2000), 146-154. Alternativamente, también se prevé una preparación de células enteras. Preferiblemente, el derivado o fragmento del microorganismo de la presente invención aquí descrito retiene la capacidad de inhibir el crecimiento de organismos fúngicos que se describe en detalle en la presente.

[0075] La invención se basa ante todo en el descubrimiento de cepas de *Lactobacillus*, que son capaces de extender el tiempo de conservación del yogur mediante la inhibición del crecimiento fúngico. Usando tal cepa de *Lactobacillus*, se puede reemplazar el conservante sorbato de potasio, empleado hasta la fecha. En experimentos, se evaluó la actividad de inhibición de células de *Lactobacillus* respecto a los hongos de las especies *Penicillium*, *Aspergillus* y *Alternaria*. Primero, se usaron células vivas de *Lactobacillus* respecto a una actividad antifúngica. Se identificó una cepa de *Lactobacillus* (*Lactobacillus brevis*) que es capaz de inhibir el crecimiento de las cepas fúngicas evaluadas. La bacteria se designó "*Lactobacillus antimold*" y se entregó a la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) bajo la designación DSM 22721 el 26 de junio de 2009.

[0076] En otro experimento, se evaluó la cepa de *Lactobacillus* en un alimento. Para este fin, la cepa de *Lactobacillus* se añadió junto con un cultivo iniciador de yogur a un medio de partida para la producción de yogur. Después de la fermentación del yogur, se añadieron esporas fúngicas y el yogur se almacenó a 7°C. En comparación con los lotes de control con y sin adición de sorbato de potasio como conservante, se observó que, en el lote con *Lactobacillus* de la invención, se ha conseguido una extensión significativa de la durabilidad, es decir, el crecimiento del hongo pudo inhibirse durante un periodo de tiempo claramente más largo que con sorbato de potasio.

[0077] El uso de tal cepa de *Lactobacillus* para la conservación de alimentos, alimentos para animales o composiciones farmacéuticas o cosméticas tiene una ventaja decisiva sobre los métodos de conservación comunes. Es un conservante biológico que no altera el sabor o la textura del alimento.

5 [0078] La invención se refiere además al uso de células de microorganismo según la invención para producir un alimento conservado, un alimento para animales o una composición farmacéutica o cosmética, donde se añaden las células de microorganismo al alimento, al alimento para animales o a la composición farmacéutica o cosmética, y a un método para conservar un alimento, un alimento para animales o una composición farmacéutica o cosmética, donde se añaden las células de microorganismo según la invención al alimento, alimento para animales o composición farmacéutica o cosmética.

10 [0079] La aplicación de las células de microorganismo según la invención es simple, en el caso de los alimentos, se añaden las células (vivas) o los lisados de las bacterias de la invención en la cantidad especificada al alimento. Se aplican consideraciones análogas a los alimentos para animales o las composiciones farmacéuticas.

EJEMPLOS

[0080] En lo que sigue, la invención se describe con más detalle con referencia a ejemplos.

15 La figura 1 muestra los resultados del ejemplo 2.

La figura 2 muestra la estabilidad de bacterias lácticas liofilizadas de la invención. La estabilidad se mide mediante unidades formadoras de colonias (UFC) por g.

La figura 3 muestra la estabilidad de bacterias lácticas congeladas de la invención, después del almacenamiento a -20°C.

20 La figura 4 muestra la estabilidad de bacterias lácticas congeladas de la invención, después del almacenamiento a -80°C.

Ejemplo 1: inhibición de hongos en alimentos.

[0081] Materiales usados:

25 Los cultivos usados fueron: cultivo iniciador de yogur Yo-Mix 401 (Danisco, Dinamarca), *Lactobacillus* DSM 22721, *Penicillium commune*, *Penicillium roqueforti*, *Anternaria alternata* y otros aislados propios, tal como *Aspergillus*.

[0082] Los productos químicos o medios usados fueron:

leche homogeneizada tratada a temperatura ultra alta, 1,5% de grasa, por ejemplo, de Campina Mark Brandenburg,

30 leche desnatada en polvo instantánea "frema Reform" de Granovita GmbH, D-87751 Heimertingen (obtenible de Reformhaus Demski),

solución de sorbato de potasio 20 mg/ml (VWR International GmbH, Darmstadt), esterilizada por filtración,

35 caldo YDA (extracto de levadura PTU (Ohly GmbH) 25,0 g/l, D(+)-glucosa monohidratada (Merck, Darmstadt) 20,0 g/l, Tween 80 (Merck, Darmstadt) 1,0 g/l, hidrogenocitrato de diamonio (Merck, Darmstadt) 2,0 g/l, acetato sódico (Merck, Darmstadt) 5,0 g/l, sulfato de magnesio heptahidratado (Merck, Darmstadt) 0,1 g/l, sulfato de manganeso (II) monohidratado (Sigma-Aldrich, Seelze) 0,05 g/l, hidrogenofosfato de dipotasio (Merck, Darmstadt) 2,0 g/l, autoclavado a 121°C durante 20 min, pH 5,7 después de autoclavar,

40 medio de yogur artificial (medio aYH), D(+)-glucosa monohidratada (Merck, Darmstadt) 22 g/l, extracto de levadura Biospringer 0207/0-MG-L (Biospringer, Maisons-Afort Cedex, Francia) 15 g/l, leche desnatada en polvo (Granovita GmbH, Heimertingen) 20 g/l, Tween 80 (Merck, Darmstadt) 1,0 g/l, hidrogenocitrato de diamonio (Merck, Darmstadt) 2,0 g/l, acetato sódico (Merck, Darmstadt) 5,0 g/l, sulfato de magnesio heptahidratado (Merck, Darmstadt) 0,1 g/l, sulfato de manganeso (II) monohidratado (Sigma-Aldrich, Seelze) 0,05 g/l, hidrogenofosfato de dipotasio (Merck, Darmstadt) 2,0 g/l,

ES 2 710 435 T3

medio de yogur (leche tratada a temperatura ultra alta (1,5% de grasa) + 2,0% p/p de leche desnatada bio),

caldo MRS (caldo MRS para lactobacilos (BD Difco, Augsburg) 55 g/l, pH 6,5),

agar de dextrosa de patata (caldo de dextrosa de patata (BD Difco, Augsburg) 24 g/l, agar, granulado (BD Difco, Augsburg) 1,5 g/l, pH 5,1), y

- 5 solución de crioprotección (glucosa monohidratada (Merck, Darmstadt) 80 g/l, peptona tripticasa (BD Difco, Augsburg) 2 g/l, magnesio heptahidratado (Merck, Darmstadt) 10 g/l, dihidrogenofosfato de potasio (Merck, Darmstadt) 4 g/l, nitrato sódico (Merck, Darmstadt) 6 g/l, cloruro de potasio (Merck, Darmstadt) 1 g/l, sulfato heptahidratado de hierro (II) (Merck, Darmstadt) 0,02 g/l, glicerina (85%) (Merck, Darmstadt) 200 g/l, pH 5,6).

[0083] Métodos usados:

- 10 Los cultivos iniciadores se prepararon disolviendo 1 g de iniciador liofilizado de yogur (Yo-Mix 401, Danisco, Dinamarca) en 500 ml de leche baja en grasa tratada a temperatura ultra alta y dejando que se hinche durante 20 min a temperatura ambiente.

[0084] El precultivo de *Lactobacillus* según la invención se realizó inoculando 9 ml de caldo YDA con 1,5 ml de cultivo congelado, seguido de incubación anaeróbica a 37°C durante 48 h.

- 15 [0085] El cultivo principal de *Lactobacillus* según la invención se realizó inoculando 30 ml de caldo YDA con el sedimento de 8 ml del precultivo, seguido de incubación anaeróbica a 37°C durante 24 h.

- 20 [0086] La fermentación de *Lactobacillus* según la invención se realizó centrifugando 28 ml del cultivo principal durante 5 min a 4.500 rpm, y se descartó el sobrenadante. El sedimento obtenido se resuspendió en 5 ml de solución estéril de NaCl al 0,9% y se transfirió por completo a un matraz Erlenmeyer de 1 l con 0,5 l de medio aYH. Posteriormente, se realizó una incubación anaeróbica a 37°C durante 24 h en un agitador a 150 rpm. Después de la fermentación, el valor del pH se ajustó a un valor de $5,5 \pm 0,1$ con 2 M de KOH.

- 25 [0087] Para producir el yogur, se añadieron 100 ml de leche tratada a temperatura ultra alta (1,5% de grasa) + 2,0 g de leche desnatada en polvo (2% p/p) dentro de un matraz Schott. Luego, la mezcla se calentó a 110°C durante 15 min en un autoclave. Después de enfriar a 42°C, se añadió 0,5 ml de cultivo iniciador de yogur recién producido. Luego, una incubación anaeróbica se realizó a 42°C para obtener un valor de pH de $4,6 \pm 0,1$. El almacenamiento hasta el uso posterior se hizo a 7°C.

- 30 [0088] Para producir una suspensión de esporas fúngicas criogénica, se sembró en placas una muestra de hongo en agar de dextrosa de patata, seguido por el cultivo durante 1-4 semanas a 25-30°C bajo condiciones aeróbicas hasta la esporulación. Luego, el cultivo se sumergió en 10 ml de cultivo de crioprotección, el sobrenadante líquido se retiró y se transfirió a criotubos. El almacenamiento de los criocultivos se hizo a -80°C.

- 35 [0089] Para preparar el hongo para el bioensayo, se sembró 0,1 ml de la suspensión criogénica de esporas fúngicas en placas en agar de dextrosa de patata, seguido por el cultivo durante 1-4 semanas a 25-30°C bajo condiciones aeróbicas hasta la esporulación. Luego, el cultivo se sumergió en 10 ml de una solución de Tween 80 al 0,1%. El sobrenadante líquido se transfirió a tubos Falcon y se almacenó a 4-6°C. Se realizó una dilución de la suspensión con H₂O destilada a 250 esporas/ml.

[0090] El bioensayo para la inhibición de hongos por *Lactobacillus* en agar de dextrosa de patata se hizo sembrando en placas 200 µl de una suspensión de esporas con 250 esporas/ml sobre una placa de agar de dextrosa de patata. Tras el secado, se perforaron 5 agujeros en la placa de agar mediante un taladro de corcho. Se pipetearon 40 µl de cada una de las mezclas siguientes:

- 40
- 1) cultivo de 24 h de *Lactobacillus* en medio MRS,
 - 2) sobrenadante de cultivo de 24 h de *Lactobacillus* en medio MRS,
 - 3) *Lactobacillus* de cultivo de 24 h en MRS, granulado y resuspendido en tampón PBS (→ células en PBS),
 - 4) medio MRS,
 - 5) PBS.

[0091] Posteriormente, se realizó un cultivo anaeróbico de la placa a temperatura ambiente durante hasta 14 días.

[0092] El bioensayo para comprobar la inhibición de hongos por *Lactobacillus* en yogur se hizo poniendo 40 ml de medio de yogur en un tubo Falcon. Luego, se añadieron 0,2 ml de cultivo iniciador. Como muestras se proporcionaron:

- 5 1) adición de 1×10^8 células de *Lactobacillus*,
- 2) control A sin *Lactobacillus*, y
- 3) control B sin *Lactobacillus*, con adición posfermentativa de 0,4 ml de solución de sorbato de potasio.

[0093] Después siguió una fermentación cada una a 42°C hasta pH = $4,6 \pm 0,1$ con enfriamiento posterior a 7°C, llenado de placas de 6 pocillos con 8 ml de cada una de las muestras, adición de 50 esporas por muestra (controles sin esporas), incubación a 7°C e inspección visual diaria para el crecimiento de hongos. Como una alternativa para la inspección visual, puede realizarse una evaluación automatizada usando una cámara digital, donde se usa un ajuste de contraste preestablecido, que distingue los hongos del sustrato subyacente. Esto permite realizar un recuento de píxeles de los píxeles que están por debajo o por encima de un umbral de brillo predeterminado y, así, se relacionan con el crecimiento de hongos. El número de píxeles puede luego establecerse en una relación con el número total de píxeles relacionados con una muestra, proporcionando una medida cuantitativa de la cantidad de hongos presentes en la muestra evaluada. Como cámara, el sistema FluorChem® FC2 Imaging System (Alpha Innotech/Cell Biosciences, Santa Clara, EE.UU.) es adecuado con los ajustes siguientes: tiempo de exposición: 100 – 150 ms, apertura: 8, ajustes de contraste: nivel del negro: 55000, nivel de blanco: 60000, gamma: 3.0, ajustes de luz: trans-luz "on", luz reflejada "on", chemi display "on", velocidad/resolución: normal/ultra. Las imágenes se analizaron con el software AlphaEaseFC.

[0094] Inhibición de crecimiento fúngico por células de *Lactobacillus* según la invención.

[0095] El bioensayo para verificar la inhibición de crecimiento fúngico por *Lactobacillus* según la invención en yogur se efectuó con los resultados siguientes. Después de 7 días, se detectó crecimiento fúngico por inspección visual en muestras sin *Lactobacillus* o sorbato de potasio (control A). Después de 9 días, se detectó crecimiento fúngico también por inspección visual en muestras con sorbato de potasio (control B). Solo después de 28 días, sin embargo, se detectó crecimiento fúngico también en muestras con las células de *Lactobacillus* según la invención. El resultado es que se consigue una clara reducción del crecimiento fúngico por células de *Lactobacillus* según la invención y, así, una extensión sustancial de la durabilidad del yogur.

Ejemplo 2

[0096] Las esporas fúngicas fueron recogidas de superficies de yogur inoculadas y cultivadas en un medio optimizado para hongos (agar de dextrosa de patata) bajo condiciones optimizadas (25°C, aeróbicas, 5 días). El uso de *Lactobacillus brevis* DSM 22721 al 0,1% no produjo ningún crecimiento fúngico en absoluto (compare la figura 1; (13). El efecto de *Lactobacillus brevis* DSM 22721 es fungicida y no fungistático. Este experimento mostró también que el efecto de *Lactobacillus brevis* DSM 22721 es superior al del sorbato de potasio (compare la Fig. 1: sorbato de potasio 11, sin sorbato de potasio 10).

LISTADO DE SECUENCIAS

[0097]

<110> ORGANOBALANCE GmbH

<120> Nuevas cepas de *Lactobacillus* y sus usos

40 <130> XII 657/12

<160> 1

<170> versión de PatentIn 3.5

<210> 1

ES 2 710 435 T3

<211> 951
 <212> ADN
 <213> *Lactobacillus brevis*

<400> 1

gcgacttttc ggattattgg gcgtaaagcg agcgcaggcg gtttttttagg tctgatgtga	60
aagccttcgg cttaaccgga gaagggcatc ggaaaccggg agacttgagt gcagaagagg	120
acagtggaac tccatgtgta gcggtgaaat gcgtagatat atggaagaac accagtggcg	180
aaggcggctg tctggtctgt aactgacgct gaggctcgaa agcatgggta gcgaacagga	240
ttagataccc tggtagtcca tgccgtaaac gatgagtgct aagtgttggg gggtttccgc	300
ccttcagtgc tgcagctaac gcattaagca ctccgcctgg ggagtacgac cgcaaggttg	360
aaactcaaag gaattgacgg gggcccgcac aagcggtgga gcatgtgggt taattcgatg	420
ctacgcgaag aaccttacca ggtcttgaca tcttctgcta acctaagaga ttaggcggtc	480
ccttcgggga cggaatgaca ggtggtgcat ggttgtcgtc agctcgtgct gtgagatggt	540
gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt attgtcagtt gccagcattt agttgggcac	600
tctggcgaga ctgccggtga caaacggag gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc	660
cccttatgac ctgggctaca cacgtgctac aatggacggt acaacgagtc gcgaaaccgc	720
gaggtcaagc taatctctta aagccgttct cagttcggat tgcaggctgc aactcgcctg	780
catgaagttg gaatcgctag taatcgtgga tcagcatgcc acggtgaata cgttcccggg	840
cccttgata caccgcccgt cacacatga gagtttgtaa caccctaaagc ccgtgaggta	900
accttcggga accagccgct taagtgggac agatgattag gtgaagtcga c	951

REIVINDICACIONES

1. Bacteria láctica, registrada como *Lactobacillus brevis* DSM 22721, o un lisado de la misma, para el uso como un aditivo alimentario, donde la bacteria láctica es heteroláctica y donde la bacteria láctica o su lisado inhibe el crecimiento de al menos un organismo fúngico.
- 5 2. Bacteria láctica según la reivindicación 1, donde la bacteria láctica **se caracteriza por el hecho de que se puede analizar según los pasos siguientes:**
- 10 a) se establece un sustrato,
 b) se establece una preparación que comprende las bacterias lácticas bajo investigación,
 c) la preparación que comprende las bacterias lácticas se añade al sustrato, opcionalmente seguido de un paso de fermentación,
 d) el producto del paso c) se muestrea en soportes de muestra, aquí se forman las muestras de ensayo,
 e) un número predeterminado de esporas fúngicas se añade a al menos una muestra de ensayo,
 f) la incubación de la muestra de ensayo obtenida en el paso e) se realiza durante una duración predeterminada a una temperatura predeterminada,
 15 g) detección, opcionalmente seguida de la evaluación del crecimiento fúngico.
3. Bacteria láctica según las reivindicaciones 1 o 2, donde la bacteria láctica es una bacteria láctica viva.
4. Bacteria láctica o un lisado de la misma según al menos una de las reivindicaciones precedentes, donde el organismo fúngico se selecciona del grupo que comprende el género *Penicillium*, en particular *Penicillium commune* o *Penicillium roqueforti*, el género *Aspergillus* y el género *Alternaria*, en particular *Alternaria alternata*,
 20 *Penicillium expansum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Eurotium herbariorum*, *Geotrichum candidum*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium sambucinum*, *Phytophthora infestans* y *Sclerotinia scerotiorum*.
5. Uso de bacterias lácticas o un lisado de las mismas según al menos una de las reivindicaciones 1 a 4 para la producción de una composición alimentaria, un alimento para animales, o una composición farmacéutica o cosmética, donde las bacterias lácticas, preferiblemente bacterias lácticas vivas, o un lisado de las mismas se añaden al alimento, al alimento para animales, o a la composición farmacéutica o cosmética.
- 25 6. Composición alimentaria, alimento para animales, o una composición farmacéutica o cosmética, que comprende las bacterias lácticas o los lisados de las mismas según al menos una de las reivindicaciones 1 a 4 en el alimento, el alimento para animales, o la composición farmacéutica o cosmética.
- 30 7. Composición alimentaria, alimento para animales, o composición farmacéutica o cosmética según la reivindicación precedente, donde la composición alimentaria, el alimento para animales, la composición farmacéutica o cosmética contiene de 10^2 a 10^{15} , preferiblemente de 10^6 o 10^8 a 10^{12} , en particular de 10^8 a 10^{10} células de bacterias lácticas o lisados de las mismas por 100 g de composición.
- 35 8. Composición alimentaria, alimento para animales, o una composición farmacéutica o cosmética según la reivindicación 6 o 7, donde las bacterias lácticas están presentes en una concentración de 0,0001% a 0,01%, preferiblemente 0,001%.
9. Composición alimentaria según al menos una de las reivindicaciones 6 a 8, donde la composición alimentaria es un producto cárnico o un producto lácteo, preferiblemente yogur, leche, queso, crema y/o requesón.
- 40 10. Método para conservar un alimento, un alimento para animales, o una composición farmacéutica o cosmética, donde las bacterias lácticas o lisados de las mismas según al menos una de las reivindicaciones 1 a 4 se añaden al alimento, al alimento para animales, o a la composición farmacéutica o cosmética.
- 45 11. Método según la reivindicación precedente, donde por 100 g de alimento, alimento para animales, o composición farmacéutica o cosmética, se añaden de 10^2 a 10^{15} , preferiblemente de 10^6 o 10^8 a 10^{12} , en particular de 10^8 a 10^{10} células de bacterias lácticas o lisados de las mismas.
12. Método según la reivindicación 10 u 11, donde las bacterias lácticas se añaden en una concentración de 0,0001% a 0,01%, preferiblemente 0,001%.

Fig. 1

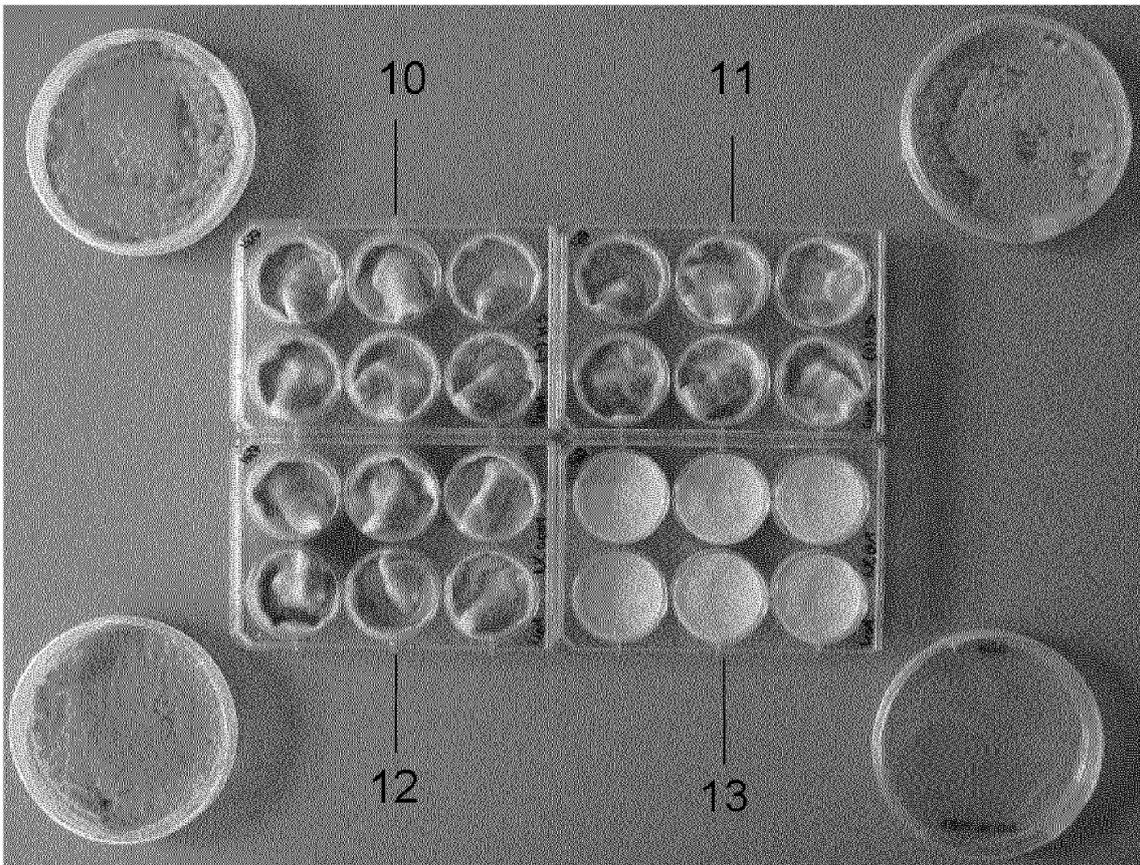


Fig. 2

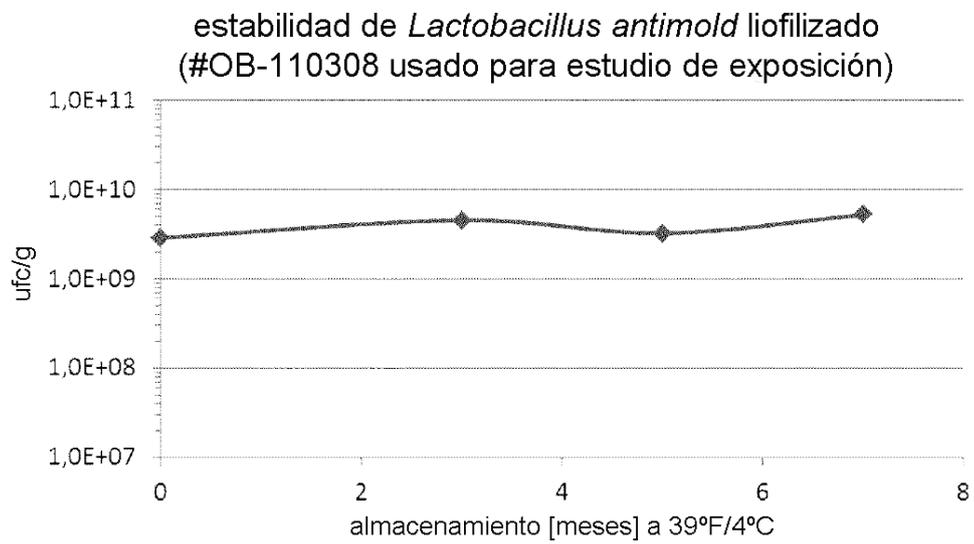


Fig. 3:

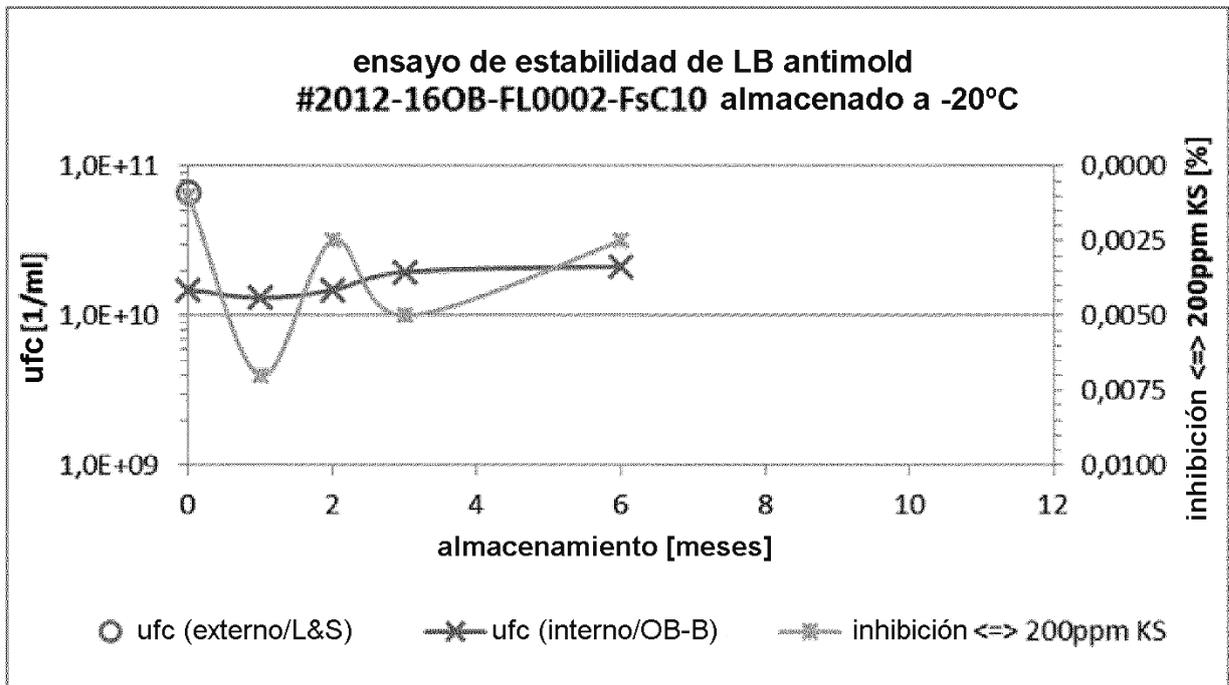


Fig. 4:

