

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 445**

51 Int. Cl.:

A23C 9/123 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2011 PCT/IB2011/051902**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012 WO12146953**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2011 E 11724295 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 2701522**

54 Título: **Uso de cepas mutantes resistentes a la nisina de lactobacilos para reducir la post-acidificación en productos alimenticios**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.05.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DRUESNE, ANNE;
GARAUULT, PEGGY y
FAURIE, JEAN-MICHEL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 762 445 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

Uso de cepas mutantes resistentes a la nisina de lactobacilos para reducir la post-acidificación en productos alimenticios

La presente invención se refiere a la reducción de la post-acidificación en productos alimenticios.

5 Durante la conservación, en particular, el almacenamiento y el transporte particular de productos alimenticios que contienen microorganismos vivos, la actividad metabólica microbiana se expresa principalmente a través de la producción de ácido, lo cual conduce al deterioro de la calidad del producto, en particular, a un excesivo sabor ácido al final de la vida útil. Este mecanismo de acidificación se denomina post-acidificación y es bien conocido. Esto es especialmente un problema en los productos a los que no se les ha añadido azúcares o saborizantes adicionales.

10 Para reducir este fenómeno, los productos deben ser almacenados a bajas temperaturas, por ejemplo a 10°C. En los países en desarrollo, no siempre es posible almacenar a una temperatura baja y asegurar una cadena del frío completa y esto tiene la desventaja de que la vida útil de los productos alimenticios se reduce drásticamente.

Además, la prevención de la post-acidificación es un tema crucial para las industrias alimentarias.

15 Hasta ahora, se ha informado de una serie de esfuerzos para reducir la producción de ácido mediante la reducción del número de células activas en el cultivo iniciador o la eliminación de células vivas del producto terminado mediante la pasteurización. En algunos de estos estudios, se ha demostrado que un agente antibacteriano denominado nisina secretado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en un medio suprime el crecimiento de las bacterias iniciadoras y controla la formación de ácidos. En el documento EP0505164, la leche fermentada se puede fabricar mediante la adición a la leche cruda de bacterias del ácido láctico productoras de nisina que pertenecen al género *Lactococcus*
 20 *lactis*, junto con otras bacterias de ácido láctico para ser utilizados para la fermentación de la leche cruda. La nisina producido y acumulado en la leche fermentada suprime el crecimiento de las bacterias que causan la formación de ácido, controlando de este modo el aumento de la acidez durante el almacenamiento y el transporte. Kalra et al. (*Indian Journal of Dairy Science* 28: 71-72 (1975)) incorporó el cultivo productor de nisina *Streptococcus lactis* (ahora conocido como *L. lactis* subsp. *lactis*) junto con el cultivo de yogur antes de la fermentación. El documento EP2294926 describe la adición de bacterias del ácido láctico productoras de bacteriocina a una mezcla de yogur, que luego son exterminadas antes de la fermentación. Otros introdujeron nisina en la leche antes de la fermentación (Bayoumi, *Chem. mikrobiol. technol. Lebensm* 13:65-69 (1991)) o después de la fermentación (Gupta et al, *Cultured Dairy Products Journal* 23:17-18 (1988); Gupta et al, *Cultured Dairy Products Journal* 23:9-10 (1989)). En todos los casos, la tasa de post-acidificación se inhibió sólo parcialmente por estos tratamientos y la leche fermentada continuó volviéndose más ácida
 25 a lo largo de su vida útil. Intentos para detener la producción de ácido por parte de los cultivos de yogur, mediante la adición de nisina o un cultivo productor de nisina antes o después de la fermentación de la leche no han tenido éxito. Como se mencionó anteriormente, este uso afecta a las bacterias vivas que tienen un gran interés para la industria alimentaria. En particular, se ha informado de cepas del grupo *Lactobacillus casei* que tienen propiedades promotoras de salud, y se utilizan como probióticos en diferentes productos alimenticios. Por otra parte, la adición del cultivo productor de nisina (*L. lactis*) no es posible en caso de producción de yogur con el fin de conservar la denominación "yogur".

En segundo lugar, varias cepas de baja acidificación se han descrito en la técnica anterior para controlar la acidificación y post-acidificación del producto fermentado fresco.

30 La post-acidificación esencialmente es el resultado de la utilización, por las bacterias, de la lactosa restante en el producto. Con el fin de prevenir eso, se ha propuesto el uso de cepas de bacterias de ácido láctico que no fermentan la lactosa, o la fermentan muy poco. Las patentes EP 1078074 y EP 1893032 describen bacterias del ácido láctico que ya no son capaces de fermentar lactosa o con baja capacidad de fermentación durante el almacenamiento. Respectivamente, la patente EP 1078074 se refiere a mutantes de *L. bulgaricus* deficientes en la actividad de la beta-galactosidasa, que comprenden una mutación sin sentido en al menos uno de los genes del operón lactosa y la patente
 45 EP 1893032 se refiere a mutantes modificados en su actividad de transporte de lactosa por mutación en la lactosa permeasa. Sin embargo, estas soluciones no se pueden utilizar en productos fermentados de vegetales o frutas, o en los productos lácteos que comprenden otros azúcares distintos de la lactosa.

El documento EP 1802652 describe la solución para disminuir la población de bacterias de ácido láctico al final del proceso de fermentación mediante la manipulación de la concentración de aminoácidos. Pero esta solución tiene un costo en términos de aminoácidos o péptidos específicos que obligatoriamente deben agregarse para mostrar un buen crecimiento de las bacterias del ácido láctico. Esta solución se demuestra sólo para *Streptococcus thermophilus*, lo cual limita las aplicaciones.

55 En el documento JP7236416 se ha desarrollado una solución utilizando mutantes resistentes a neomicina de bacterias del ácido láctico que tienen una actividad de H⁺-ATPasa alterada. Se supone que las bacterias detienen la acidificación cuando ya no son capaces de generar un gradiente de pH entre el medio y el citoplasma celular. Sin embargo, el uso de bacterias de resistencia a antibióticos es siempre cuestionable desde el punto de vista de la seguridad. Por lo general, la resistencia a antibióticos es un criterio de rechazo de la cepa durante un proceso de selección de la cepa.

Todas las soluciones presentan ventajas y también desventajas, dependiendo del tipo de aplicaciones. Por lo tanto, nuevas soluciones para evitar la excesiva post-acidificación son bienvenidos con el fin de tener diferentes herramientas para las diferentes especies para reducir la post-acidificación.

5 Los inventores sorprendentemente encontraron que cuando mutantes resistentes a la nisina de bacterias del ácido láctico, en particular, de *L. helveticus* y *L. bulgaricus*, se añaden a los productos alimenticios, la post-acidificación se reduce.

Un objeto de la presente invención es el uso de al menos un mutante resistente a la nisina en productos alimenticios para reducir la post-acidificación.

10 Otro objetivo de la invención es proporcionar un método para reducir la post-acidificación en productos alimenticios y un producto alimenticio obtenible por este método.

La presente invención se refiere al uso de al menos una cepa de lactobacilos vivos resistentes a la nisina para reducir la post-acidificación en productos alimenticios.

15 El término "lactobacilos" designa todas las especies del género *Lactobacillus* subsp. Éstas representan una parte importante del grupo de bacterias del ácido láctico a nivel industrial y se utilizan particularmente en la fermentación de productos lácteos en combinación con *Streptococcus thermophilus*. También se utilizan como probióticos en varios productos alimenticios con el fin de dar propiedades que fomentan la salud (Lebeer et al, 2008) [ref: Lebeer S., Vanderleyden J., y De Keersmaecker S.C.J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, diciembre de 2008, 72 (4), p. 728-764].

20 Los lactobacilos se seleccionan típicamente del grupo que consiste en *Lactobacillus helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. brevis* y *L. fermentum*.

Preferiblemente, pertenece a la especie *L. helveticus*, *L. delbrueckii* y sus subespecies, en particular, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

25 Lactobacilos particularmente preferidos se seleccionan de entre el grupo que consiste en CNCM I-4452, CNCM I-4453 y CNCM I-4454.

Los lactobacilos que se utilizan en la invención se obtienen preferiblemente de las cepas madre seleccionadas del grupo que consiste en *L. bulgaricus* CNCM I-2836 y *L. helveticus* CNCM I-3435.

30 En la presente invención, los lactobacilos utilizados son bacterias vivas. El término "vivo" en la invención designa lactobacilos que están vivos en el momento de uso y en el producto hasta el fin de la vida útil del producto, en particular hasta 28 días a una temperatura de 10°C. Este estado es importante, en particular en los yogures para los que las directrices oficiales (el Codex Alimentarius (preparado por la Comisión del codex Alimentarius en el marco de la FAO y el contenido del ODM, y publicado por la División de Información de la FAO, disponible en línea en <http://www.codexalimentarius.net> requiere que un producto sea designado como yogur si contiene al menos una cepa de *S. thermophilus* y al menos una cepa de *L. bulgaricus* en la forma viva en una cantidad de al menos 1*10⁷ ufc/g de la porción láctica.

35 Las cepas de lactobacilos que son más particularmente adecuadas para uso en la presente invención tienen una resistencia a la nisina de por lo menos 6,25 µg/ml M.I.C. , en particular al menos 12,5 µg/ml M.I.C. El término "MIC." define la concentración inhibitoria mínima y designa en esta memoria, la menor concentración de nisina que inhibe el crecimiento de lactobacilos después de la incubación durante la noche. La MIC se puede determinar por varios métodos bien conocidos, tales como el método de microdilución en medio líquido o sólido (Klare et al., 2005). Ref: Ingo Klare, Carola Konstabel, Sibylle Müller-Bertling, Rolf Reissbrodt, Geert Huys, Marc Vancanneyt, Jean Swings, Herman Goossens y Wolfgang Witte Evaluation of New Broth Media for Microdilution Antibiotic Susceptibility Testing of Lactobacilli, *Pediococci, Lactococci y Bifidobacteria Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 8982-8986, 71(12).

45 Como es bien conocido en la técnica, la nisina es un péptido de calidad alimentaria antimicrobiano, un lantibiótico, producido por algunas cepas de *Lactococcus lactis* y es activo contra una amplia gama de bacterias Gram-positivas. La nisina ha ganado importancia en la industria alimentaria, en donde se utiliza para controlar el crecimiento de los formadores de esporas en conservas y de la flora microbiana no deseada en los productos lácteos.

50 En la invención, la nisina no se utiliza como se ha mencionado anteriormente, sino que se utiliza como agente selectivo para seleccionar cepas con propiedades de baja post-acidificación. La expresión "lactobacilos resistentes a la nisina" tal como se usa en esta memoria, designa cepas seleccionadas por crecimiento en presencia de nisina. En otras palabras, las cepas que son capaces de crecer con la nisina se han aislado de un cultivo de lactobacilos tipo salvaje.

En la presente invención, la expresión "producto alimenticio" designa productos seleccionados de entre el grupo que consiste en productos lácteos, zumos de frutas, productos vegetales, fórmulas infantiles, leche en polvo.

De acuerdo con una realización particular, el producto alimenticio se fermenta. Un "producto alimenticio fermentado" es un producto que ha sufrido al menos una etapa de fermentación.

De acuerdo con una realización particular, los productos fermentados se seleccionan del grupo que consiste en productos lácteos fermentados, zumos fermentados, productos vegetales fermentados.

- 5 La expresión "zumos fermentados" se refiere al producto obtenido por fermentación de zumos de frutas, en particular zumo de naranja, zumo de manzana, zumo de limón, zumo de pera.

La expresión "productos vegetales fermentados" se refiere al producto obtenido por fermentación de zumos vegetales incluyendo el zumo de soja, zumo de avena y zumo de arroz, o por la fermentación de la leche de origen vegetal o fermentación en estado sólido de hortalizas.

- 10 De acuerdo con una realización más particular, los productos lácteos fermentados se seleccionan del grupo que consiste en yogures, leches fermentadas, leches infantiles fermentadas, bebidas fermentadas. La expresión "leches fermentadas" y el término "yogures" tienen los significados usuales que se les atribuyen en la industria láctea, es decir, productos destinados al consumo animal, más particularmente el consumo humano, y que se derivan de acidificar la fermentación láctica de un sustrato lácteo (leche de animal, en particular leche de vaca). Dichos productos pueden
 15 contener ingredientes secundarios, tales como frutas, hortalizas, azúcares, saborizantes, almidón, espesantes, etc., a condición de que estos ingredientes sean adecuados para el consumo humano o animal. Más en particular, la denominación "leche fermentada" (decreto n.deg 88. -1203 de 30 de diciembre, 1988) se reserva para un producto lácteo elaborado con leche descremada o no, o las leches condensadas o algunos polvos que hayan sufrido un
 20 tratamiento térmico por lo menos equivalente a la pasteurización e inoculados con microorganismos productores de ácido láctico tales como los lactobacilos (*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*), ciertos estreptococos (*Streptococcus thermophilus*), bifidobacterias (*Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. short*, *B. animalis*) y los lactococos. Por otra parte, el término "yogur" (yogurt) se reserva para la leche fermentada obtenida, usando métodos estándares, por el desarrollo de bacterias lácticas termófilas específicas denominadas *Lactobacillus bulgaricus* (también designadas *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) y *Streptococcus thermophilus*, que deben
 25 estar vivos en el producto acabado, en una cantidad de al menos 1.10^7 ufc de bacterias *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* por gramo de producto, expresado como la parte láctica del producto.

Preferiblemente, de acuerdo con la invención, los productos alimenticios fermentados se fermentan con al menos una cepa de lactobacilos resistentes a la nisina.

- 30 De acuerdo con una realización más particular, el producto alimenticio comprende otras bacterias vivas seleccionadas de entre el grupo que consiste en *Streptococcus* spp.; *Lactobacillus* spp, en particular, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* y *L. casei*, *L. helveticus*, *Lactococcus* spp. y *Bifidobacterium* spp.

- 35 De acuerdo con una realización particular, el producto alimenticio se almacena a temperatura ambiente, o a temperaturas de 0°C a 25°C, más particularmente a temperaturas de 4°C a 10°C, más específicamente a temperaturas de 6°C a 8°C durante un período de al menos 20 días, en particular de al menos 28 días. El producto alimenticio se puede almacenar alternativamente a una temperatura entre 0°C y 25°C y a temperatura ambiente, o inversamente. En este último caso, la cadena del frío se rompe.

- 40 De acuerdo con la invención, el producto alimenticio tiene una reducción de la post-acidificación en comparación con productos alimenticios que no utilizan lactobacilos resistentes a la nisina. La expresión "reducción de la post-acidificación" designa la capacidad de los lactobacilos resistentes a la nisina para producir menos ácido durante el almacenamiento del producto alimenticio. En la presente invención, los lactobacilos resistentes a la nisina tienen una menor post-acidificación que la de la cepa madre de la que se derivan. Bajo las mismas condiciones de almacenamiento (28 días de almacenamiento a 4°C), la ΔpH (diferencia entre el pH el día 0 (D0) y el pH el día 28 (D28)) es del orden de 0,3 en el caso de las cepas madre, y la ΔpH es del orden de 0,1 a 0,2 en el caso de cepas mutantes.

- 45 De acuerdo con la invención, una reducción de la post-acidificación es una reducción de la ΔpH de al menos 0,1 unidades de pH (upH), en particular 0,2 upH.

La presente invención también se refiere a un método para reducir la post-acidificación en productos alimenticios, en donde dicho método comprende una etapa de adición de al menos una cepa de lactobacilos resistentes a la nisina en una matriz alimentaria.

- 50 La expresión "matriz alimentaria" designa el producto alimenticio antes de la adición de lactobacilos resistentes a la nisina, en particular, designa productos seleccionados de entre el grupo que consiste en productos lácteos, zumos de frutas, productos de hortalizas, fórmulas infantiles, leches en polvo.

- 55 En una realización ventajosa, en el método de la invención los lactobacilos se seleccionan del grupo que consiste en *Lactobacillus helveticus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp *lactis*, *L. delbrueckii* subsp *delbrueckii*, *L. brevis* y *L. fermentum*.

En una realización más ventajosa, en el método de la invención, los lactobacilos se seleccionan de entre el grupo que consiste en CNCM I-4452, CNCM I-4453 y CNCM I-4454.

En una realización particular, en el método de la invención, la cepa tiene una resistencia a la nisina de por lo menos 6,25 µg/ml M.I.C., en particular al menos 12,5 µg/ml M.I.C.

- 5 Según la realización preferida, en el método de la invención, la adición de los lactobacilos resistentes a la nisina se realiza durante, antes o después de la etapa de fermentación del producto alimenticio fermentado. En el caso de productos sin fermentar, la adición de los lactobacilos resistentes a la nisina se realiza antes de su almacenamiento.

De acuerdo con una realización particular, los productos fermentados se seleccionan del grupo que consiste en productos lácteos fermentados, zumos fermentados, y productos de hortalizas fermentados.

- 10 De acuerdo con una realización más preferida, en el método de la invención, la fermentación se lleva a cabo en presencia de al menos otra bacteria viva.

Dichas bacterias vivas se seleccionan del grupo que consiste en *Streptococcus* spp. *Lactobacillus* spp, en particular, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* y *L. casei*; *L. helveticus*, *Lactococcus* spp. y *Bifidobacterium* spp.

De acuerdo con una realización preferida, el método de la invención comprende las siguientes etapas:

- 15 a. Proporcionar una cepa viva de lactobacilos resistentes a la nisina,
b. Inocular una matriz alimentaria con la cepa obtenida en la etapa a),
c. Fermentar el alimento inoculado a una temperatura de 4°C a 50°C, hasta que se alcanza un pH objetivo deseado
d. Recuperar y almacenar el producto obtenido en la etapa c), a una temperatura de 4 a 40°C durante al menos 28 días.

- 20 El pH objetivo puede tener un valor entre 3,6 y 5,0.

También se describe un producto alimenticio obtenible mediante el procedimiento de la invención.

El producto de la invención es preferiblemente un producto lácteo fermentado.

- 25 La presente invención también se refiere a una cepa mutante de *L. bulgaricus* depositada de acuerdo con el Tratado de Budapest el 10 de marzo de 2011 en la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de microorganismos) realizada por el Instituto Pasteur bajo el número I-4452.

- 30 La invención también se refiere a una cepa mutante de *L. bulgaricus*, presentada el 3 de marzo de 2011 en la CNCM bajo el número I-4453 y una cepa mutante de *L. helveticus*, presentada el 10 de marzo de 2011 en la CNCM bajo el número I-4454. Estas cepas se derivan de la *L. bulgaricus* CNCM I-2836 (depositada en la CNCM el 4 de abril de 2002) y *L. helveticus* CNCM I-3435 (depositada en la CNCM el 5 de mayo de 2005), respectivamente. Las cepas mutantes CNCM I-4452, 4453 y 4454 tienen una resistencia a la nisina de por lo menos 6,25 µg/ml M.I.C., en particular al menos 12,5 µg/ml M.I.C.

La presente invención también se refiere a cepas mutantes de *L. bulgaricus* y *L. helveticus*, caracterizadas porque dichas mutantes tienen una resistencia a la nisina de por lo menos 6,25 µg/ml M.I.C., en particular al menos 12,5 µg/ml M.I.C..

- 35 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un fermento láctico (iniciador) que comprende al menos una cepa mutante como se describió anteriormente. De acuerdo con una realización específica, un fermento láctico según la invención comprende al menos una cepa mutante de *L. bulgaricus* y/o *L. helveticus* combinada con al menos otra cepa de bacterias del ácido láctico, por ejemplo, *Streptococcus* spp.; *Lactobacillus* spp, en particular, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* y *L. casei*; *L. helveticus*, *Lactococcus* spp. y *Bifidobacterium* spp.

40 FIGURAS

Esta invención se ilustra mediante las siguientes figuras:

- 45 Figura 1: La Figura 1 representa la cinética de acidificación de las cepas CNCM I-2836 y los clones I-4452 e I-4453. El eje de ordenadas corresponde al pH y el eje de abscisas corresponde al tiempo (en horas). La línea en negro corresponde a las cepas de *L. bulgaricus* CNCM I-4452. La línea de color gris corresponde a las cepas de *L. bulgaricus* CNCM I-4453. La línea con el círculo gris (que da una línea gris gruesa debido al gran número de puntos experimentales) corresponde a las cepas de *L. bulgaricus* CNCM I-2836.

Figura 2: La Figura 2 representa la medición del pH y de la acidez de 3 productos lácteos frescos (con I-2836, I-4453 e I-4452) después de 28 días de almacenamiento. El histograma representa la acidez medida a los 28 días (en °D) y la curva representa el pH medido a los 28 días.

EJEMPLOS

La presente invención se explicará con referencia a los ejemplos que se dan para ilustración solamente y no están destinados a limitar la invención.

EJEMPLO 1: OBTENCIÓN DE LACTOBACILOS RESISTENTES A LA NISINA

- 5 Cepas madre I-2836 e I-3435, seleccionadas para esa aplicación son cepas industriales utilizadas para la fabricación de leche fermentada que muestran una post-acidificación significativa durante el almacenamiento.

1) Evaluación de la sensibilidad de un *Lactobacillus bulgaricus* y *L. helveticus* a la nisina

- 10 Para evaluar la sensibilidad a la nisina de la cepa *L. bulgaricus* I-2836 y *L. helveticus* I-3435 las cepas se cultivan en un rango de tubos MRS que contienen cantidades crecientes de nisina. Después de 16 h a 37°C, se mide la densidad óptica de cada cultivo.

2) Obtención de lactobacilos resistentes a la nisina

- 15 Las cepas de *L. bulgaricus* I-2836 y *L. helveticus* I-3435 se cultivaron en medio MRS con una concentración inhibitoria de nisina. Después de 16 h a 37°C, se centrifugaron 10 ml de cultivo. Los sedimentos se suspendieron en 100 µl de solución de peptona-solución salina y se rociaron sobre medio de agar MRS en placas de Petri. Un trozo de papel secante se colocó en el centro de la placa y luego se empapó con 15 µl de una solución de nisina 2,5 mg/ml. Después de 72 h de incubación a 37°C, clones resistentes aparecieron en la zona de inhibición alrededor del disco de papel secante. Los clones que estaban más cercanos al disco se recuperaron para el análisis. En particular, su sensibilidad a la nisina se puso a prueba en medio líquido utilizando cantidades crecientes de concentración de nisina.

- 20 Todos los clones obtenidos, en particular, I-4452 e I-4453 e I-4454 tienen una concentración inhibitoria mínima de al menos 6,25 µg/ml µM. Esta M.I.C. confirma la resistencia de los clones a la nisina.

A continuación se estudiaron los clones I-4452 e I-4453 obtenidos por fermentación de la leche. La cinética de acidificación proporcionó información sobre la capacidad acidificante de la leche de estos clones.

3) Cinética de acidificación de la leche con clones derivados de la cepa I-2836

a) Preparación de productos lácteos frescos

- 25 El inóculo de cultivo iniciador se compone de:

- Cepa I-4452
- Cepa I-4453
- Cepa I-2836

Las cepas se hicieron crecer dos veces en medio MRS que contiene 6,25 µg de nisina/ml.

- 30 Los iniciadores se prepararon en 100 ml de leche esterilizada (135 g/L de leche en polvo y 2 g/L de extracto de levadura). La tasa de inoculación fue de 2% y las leches se incubaron a 44°C hasta que se alcanzó una acidez Dornic de 70. Las leches fermentadas se almacenaron una noche a 4°C.

- 35 Productos lácteos se prepararon a partir de 100 ml de leche esterilizada y se inocularon con el cultivo mixto anterior. Los cultivos se cultivaron a 44°C hasta que alcanzaron un valor de pH de aproximadamente 4,75. A continuación, se enfriaron a 4°C y se almacenaron a 4°C durante 28 días.

b) Seguimiento de la cinética de acidificación

La cinética de acidificación fue seguida continuamente con un sistema de CINAC (Ysebaert, Francia), que permite la medición continua de valores de pH.

- 40 Se puede observar a partir de la FIG. 1 que la cinética de acidificación es más lenta para los clones que para la cepa madre I-2836;

4) Medición del pH y la acidez del producto lácteo fresco después de 28 días de almacenamiento

La medición se llevó a cabo en 3 productos lácteos frescos que contenían 2 clones derivados de la cepa I-2836 (I-4452 y I-4453) y uno que contenía la cepa I-2836.

Su acidez se midió después de 28 días de almacenamiento a 4°C.

ES 2 762 445 T3

Cepa	Tiempo de fermentación	pH al final de la fermentación	Acidez (°D) día 0	pH día 28	Acidez (°D) día 28
I-2836	3h 25	4,74	77°D	4,43	116°D
I-4453	8 h	4,75	75°D	4,55	104°D
I-4452	8h 25	4,75	76°D	4,62	99°D

Estos resultados se muestran en la Figura 2.

Los productos con lactobacilos resistentes a la nisina han demostrado una débil post-acidificación después de 28 días.

REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos una cepa de lactobacilos resistentes a la nisina para reducir la post-acidificación en un producto alimenticio.
- 5 2. El uso según la reivindicación 1, en el que los lactobacilos se seleccionan del grupo que consiste en *Lactobacillus helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. brevis* y *L. fermentum*.
3. El uso según la reivindicación 2, en el que los lactobacilos se seleccionan particularmente de *L. helveticus*, *L. delbrueckii* y sus subespecies, en particular, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.
- 10 4. El uso según la reivindicación 3, en el que los lactobacilos se seleccionan entre el grupo que consiste en CNCM I-4452, CNCM I-4453 y CNCM I-4454.
5. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, en el que la cepa tiene una resistencia a la nisina de por lo menos 6,25 µg/ml Concentración Inhibidora Mínima, en particular por lo menos 12,5 µg/ml Concentración Inhibidora Mínima.
6. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en el que el producto alimenticio se selecciona de entre el grupo que consiste en productos lácteos, leche, zumos de frutas, productos de hortalizas, fórmulas infantiles, leche en polvo.
- 15 7. El uso según las reivindicaciones 1 a 6, en el que los productos fermentados se seleccionan del grupo que consiste en productos lácteos fermentados, zumos fermentados, productos de hortalizas fermentados.
8. Un método para reducir la post-acidificación en productos alimenticios, en el que dicho método comprende una etapa de adición de al menos una cepa viva de lactobacilos resistentes a la nisina en una matriz alimentaria.
- 20 9. Método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que los lactobacilos se seleccionan del grupo que consiste en *Lactobacillus*, *helveticus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii* subsp. *m. bulgaricus* y *L. fermentum*.
10. Método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que los lactobacilos se seleccionan del grupo que consiste en CNCM I-4452, CNCM I-4453 y CNCM I-4454.
- 25 11. Método de acuerdo con las reivindicaciones 8 a 10, en el que la cepa tiene una resistencia a la nisina de por lo menos 6,25 µg/ml Concentración Inhibidora Mínima, en particular al menos 12,5 µg/ml Concentración Inhibidora Mínima.
12. Método de acuerdo con las reivindicaciones 8 a 11, en el que la adición de los lactobacilos resistentes a la nisina se realiza durante, antes o después de la etapa de fermentación del producto alimenticio.
- 30 13. Método de acuerdo con las reivindicaciones 8 a 12, en el que la fermentación se lleva a cabo en presencia de al menos otra bacteria viva.
14. Método de acuerdo con las reivindicaciones 8 a 13, en el que dicha otra bacteria viva es una bacteria láctica viva, seleccionada de entre el grupo que consiste en *Streptococcus* spp.; *Lactobacillus* spp, en particular, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* y *L. casei*, *L. helveticus*, *Lactococcus* spp. y *Bifidobacterium* spp.
- 35 15. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho método comprende:
 - a. proporcionar una cepa de lactobacilos vivos resistentes a la nisina
 - b. inocular una matriz alimentaria con la cepa obtenida en la etapa a),
 - c. fermentar el medio inoculado a una temperatura de 4°C a 50°C, hasta que se alcanza un pH objetivo deseado
 - d. recuperar y almacenar el producto obtenido en la etapa c), a una temperatura de 4 a 40°C durante al menos 28 días.
- 40 16. Cepa mutante de *L. bulgaricus*, presentada el 10 de marzo de 2011 en la CNCM bajo el número I-4452.
17. Cepa mutante de *L. bulgaricus*, presentada el 10 de marzo de 2011 en la CNCM bajo el número de I-4453.
18. Cepa mutante de *L. helveticus*, presentada el 10 de marzo de 2011 en la CNCM bajo el número I-4454.

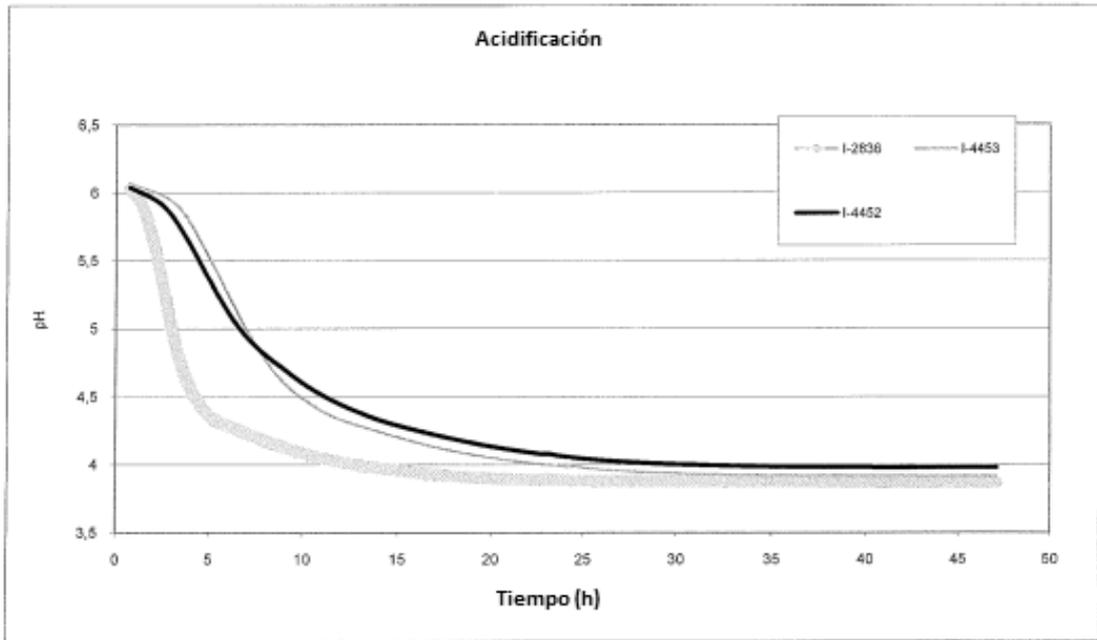


FIGURA 1

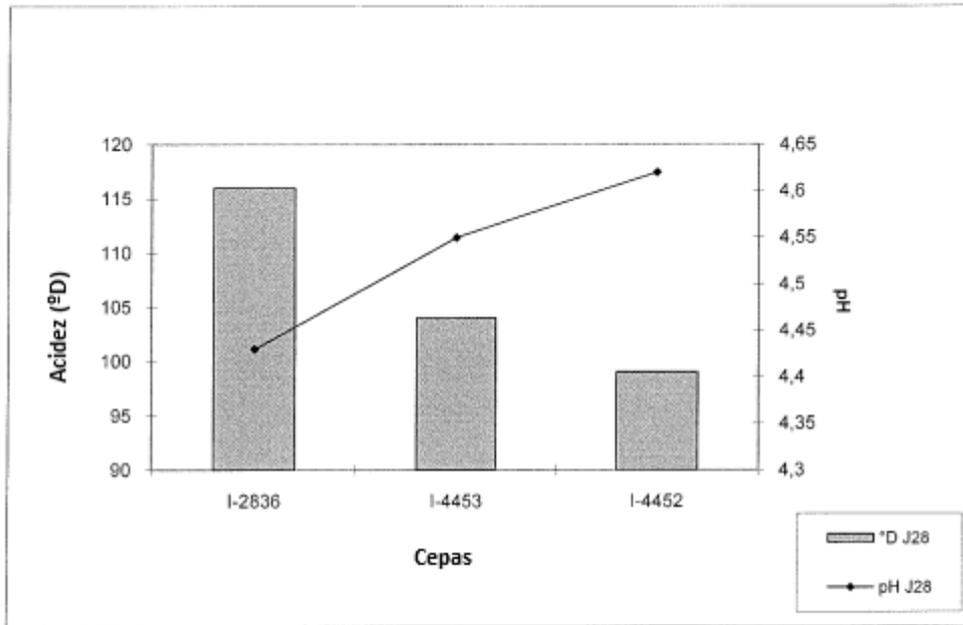


FIGURA 2