

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
6 de Julio de 2006 (06.07.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/070041 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2005/070174

(22) Fecha de presentación internacional:
7 de Diciembre de 2005 (07.12.2005)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200403108
28 de Diciembre de 2004 (28.12.2004) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, 28006 Madrid
(ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **SANZ
HERRANZ, Yolanda** [ES/ES]; Insto. Agroquímica y
Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Inves-
tigaciones Científicas, Apartado 73, 46100 Burjassot
(VALENCIA) (ES). **COLLADO AMORES, María del
Carmen** [ES/ES]; Insto. Agroquímica y Tecnología de Al-
imentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas,
Apartado 73, 46100 Burjassot (VALENCIA) (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— sin informe de búsqueda internacional, será publicada nue-
vamente cuando se reciba dicho informe

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: COMPOUNDS WITH ANTIFUNGAL ACTIVITY, WHICH ARE PRODUCED BY *BIFIDOBACTERIUM* SPP

(54) Título: COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA PRODUCIDOS POR *BIFIDOBACTERIUM* SPP

(57) Abstract: The invention relates to metabolic cellular compounds with antifungal activity from strains of the genus *Bifidobacterium*. The compounds resulting from the metabolism of strains of the genus *Bifidobacterium*, which take the form of extracts, contain protein and non-protein compounds with antifungal activity. The compounds produced by bifidobacteria have a wide range of activity including yeasts and fungi and, among same, important mycotoxin producers. The aforementioned strains and metabolic products can be used as bioprotectors, preservatives and biological fungicides against alterative yeasts and fungi of zoo- or phyto-sanitary interest in agri-food products and in pharmaceutical formulations.

(57) Resumen: La presente invención aporta compuestos celulares y metabólicos con actividad antifúngica de cepas del género *Bifidobacterium*. Los compuestos resultantes del metabolismo de cepas del género *Bifidobacterium*, aportados en forma de extractos, contienen compuestos proteicos y no proteicos con actividad antifúngica. Los compuestos producidos por las bifidobacterias presentan un amplio espectro de actividad que incluye levaduras y hongos y, entre estos últimos, importantes productores de micotoxinas. Estas cepas y sus productos metabólicos pueden ser empleados como bioprotectores, conservantes y fungicidas biológicos frente a levaduras y hongos alterantes y de interés zoo- o fitosanitario, en productos agroalimentarios y en formulaciones farmacéuticas.

WO 2006/070041 A2

TITULO**COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA PRODUCIDOS POR BIFIDOBACTERIUM SPP.****5 SECTOR DE LA TÉCNICA**

Esta patente pertenece al sector de la técnica de la Industria Agroalimentaria y Farmacéutica. Más concretamente, esta invención se enmarca dentro de las tecnologías de control y conservación de cultivos y productos agroalimentarios destinados a alimentación humana o animal por
10 métodos biológicos, a través del uso de microorganismos con actividad antimicrobiana y de sus metabolitos, y del campo de la alimentación funcional (probióticos).

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 Los hongos y levaduras son microorganismos responsables de la alteración de un gran número de productos destinados a alimentación humana (cereales, vinos, encurtidos, zumos y derivados de frutas, derivados lácteos, etc) y animal (Legan, 1993. Mould spoilage of bread: the problem and some solutions. Int. Biodeterior. Biodegrad. 32: 33-53. Loureiro *et al.*, 2003. Spoilage yeast in the
20 wine industry. Int. J. Food Microbiol. 86: 23-5.). Esta contaminación puede surgir en los primeros estadios de la producción en campo, con la consiguiente alteración y contaminación de granos y frutos, y es causa de grandes pérdidas económicas en diversos sectores industriales (Llorens *et al.*, 2004. Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates
25 of *Fusarium* spp. from Spanish crops. Int. J. Food Protec. 94: 43-54).

Entre las especies de hongos que se desarrollan en los cultivos y productos agroalimentarios se encuentran además importantes productores de metabolitos secundarios tóxicos, como las micotoxinas. Estos metabolitos
30 suponen un riesgo importante para la salud por sus propiedades nefrotóxicas, hepatotóxicas, neurotóxicas, teratogénicas, estrogénicas y cancerígenas. Los principales hongos productores de micotoxinas pertenecen a los géneros

Aspergillus, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* y las principales toxinas que producen son las aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, fumonisinas, fusaricinas, moniliformina, patulina, ácido ciclopiazónico y alternariol, entre otras.

- 5 Algunos hongos y levaduras también son responsables de infecciones y se consideran patógenos o patógenos oportunistas (*Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., etc.). Las especies de *Candida* son unas de las principales responsables de infecciones (candidiasis) de diversos tipos (intestinales, vaginales, urogenitales, orales, cutáneas, etc). La candidiasis es
10 frecuentemente producida por *C. albicans* aunque puede ser debida a otras especies como *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*.

 Los mecanismos aplicados actualmente para evitar el desarrollo de hongos y levaduras no deseables en cultivos y productos destinados a alimentación humana y animal incluyen tratamientos físicos, químicos y biológicos. En este
15 ámbito, las técnicas de conservación por métodos biológicos, mediante el uso de microorganismos productores de compuestos antifúngicos o de sus metabolitos son unas de las más atractivas (Stiles, 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. Anton. Leeuw. 70: 331-345). En las últimas décadas, el uso de bacterias lácticas y sus metabolitos como conservantes biológicos ha
20 despertado un gran interés en la industria alimentaria ya que los integrantes de este grupo microbiano se consideran, en su mayor parte, seguros (GRAS). No obstante, la mayor parte de estudios y aplicaciones se basan exclusivamente en su actividad antibacteriana (Riley *et al.*, 2002. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. Ann. Rev. Microbiol. 56:117-137). La síntesis de
25 metabolitos con actividad antifúngica sólo se ha atribuido a un número limitado de cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Propionibacterium* (Corsetti *et al.*, 1998. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50:253-256; Lavermicocca *et al.*, 2000. Purification and
30 characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4048-4090; Magnusson *et al.*, 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl.*

Environ. Microbiol. 67: 1–5; Sjögren *et al.*, 2003. Antifungal 3-Hydroxy Fatty Acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7554-7557; Schwenninger *et al.*, 2004. A mixed culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeast. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 229-237). En cuanto a las aplicaciones desarrolladas en el campo de la conservación de alimentos y otros materiales propensos a sufrir alteraciones por desarrollo de hongos y levaduras se pueden citar: un cultivo de *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* productor de una sustancia antifúngica (King *et al.*, 1999. Method for inhibiting fungi. US Patent Number 4,956,177), un co-cultivo de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* y *Propionibacterium freudenreichii* susp. *shermanii* (BioProfit; Valio Ltd. Helsinki, Finlandia; Wiesby, GMBH&Co., Niebül, Alemania) y una mezcla de *Propionibacterium jensenii* y *Lactobacillus* con actividad antifúngica y antibacteriana (Miescher Schwenninger *et al.*, 2003. Mixtures of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus* sp. with antimicrobial activities for use as a natural preservation system. EP 1 308 506 A1). En el campo clínico, con fines terapéuticos o profilácticos, se han patentado diversas combinaciones de cepas de bacterias lácticas activas frente a *Candida* para infecciones gastrointestinales, dérmicas, orales, vaginales y urogenitales (Tetsuo *et al.* 1997. Therapeutic agent for dermatophathy having antifungal action, JP9263539; Dohnalek *et al.* 1999. Composition of treatment of candidiasis WO 99/17788; Khaziev *et al.*, 2002. Medical preparation for prophylaxis and treatment of urogenital infections, RU2185842).

Los compuestos antifúngicos producidos por bacterias lácticas e identificados hasta la fecha se dividen en dos grandes grupos: (i) compuestos de bajo peso molecular (menores de 1000 Da) entre los que se incluyen los ácidos acético, benzoico, fenil-láctico, 4-hidroxifenil láctico y caprónico, metilidantoína, mevanololactona y ciclo-glicil-leucina; y (ii) proteínas antimicrobianas (mayores de 1000 Da) similares a las bacteriocinas. Estos compuestos proteicos se han identificado, tan sólo, en *Lactobacillus* spp. y se denominan “bacteriocin-like compounds”, ya que no encajan con los criterios que definen las bacteriocinas porque tienen un espectro de acción más amplio (Okkers *et al.* 1999. Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like

peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with fungistatic effect on *Candida albicans*. J. Appl. Microbiol. 87: 726-734; Magnusson *et al.*, 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. Appl. Environ. Microbiol. 67: 1-5;
5 Atanassova *et al.*, 2003. Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. Int. J. Food Microbiol. 87: 63-73). No obstante, los compuestos proteicos con actividad antifúngica identificados hasta ahora tienen actividad destacada sólo frente a levaduras o sólo frente a hongos,
10 sin que se hayan descrito cepas ni compuestos con actividad inhibitoria importante frente a los dos grupos de microorganismos simultáneamente.

Los microorganismos del género *Bifidobacterium* son habitantes naturales de tracto intestinal del hombre y animales. Se incluyen habitualmente dentro del grupo de bacterias lácticas, definido fisiológicamente por su capacidad para
15 producir ácido láctico como uno de los principales metabolitos resultantes de la fermentación de carbohidratos, aunque filogenéticamente se incluyen dentro de la clase *Actinobacteria* (O'Riordan, *et al.* 1997. Determination of genetic diversity within the genus *Bifidobacterium* and estimation of chromosomal size. FEMS Microbiol. Lett. 156: 259-264). Actualmente, las cepas de este género
20 constituyen uno de los grupos más importantes de probióticos por sus reconocidos efectos beneficiosos sobre la salud y se incluyen en la elaboración de un número cada vez más amplio de alimentos (leches fermentadas, quesos, formulaciones infantiles, etc.) y preparaciones farmacéuticas. Este género se considera, por ejemplo, esencial en el mantenimiento del equilibrio del
25 ecosistema intestinal y el desplazamiento de microorganismos potencialmente perjudiciales, por lo que se le atribuye una importante función protectora. A cepas de este género se les ha atribuido efectos beneficiosos en el tratamiento de la diarrea del viajero, las infecciones por rotavirus, la diarrea asociada al uso de antibióticos y las infecciones intestinales y extraintestinales causadas por
30 *Candida* spp. (Dohnalek *et al.*, 1999. Composition of treatment of candidiasis. WO 99/17788; Levchenko, *et al.* 2001. Strain bifidobacterium breve 79-88 used for preparing curative-prophylactic fermented-milk, nonfermented-milk food-stuffs, biologically active supplements and bacterial preparations. RU2176270;

Neeser, *et al.* 2001. New bifidobacteria preventing diarrhea caused by pathogenic bacteria. WO 01/11015 A1; McNaught, *et al.* 2001. Probiotics in clinical practice: a critical review of the evidence. *Nutr. Res.* 21: 343-353). No obstante, los efectos antagónicos de las bifidobacterias frente a la flora competitiva se han atribuido a la competición por sitios de adhesión, a sus propiedades inmunomoduladoras y a la producción de ácidos orgánicos, sin que existan evidencias claras de la implicación de compuestos antimicrobianos de naturaleza proteica (Asahara, *et al.* 2001. Increased resistance of mince to *Salmonella enterica* serovar *Thyphimurium* infection by symbiotic administration of Bifidobacteria and transgalactosylated oligosaccharides. *J. Appl. Microbiol.* 91: 985-996; Bruno, *et al.* 2002. Inhibition of pathogenic and putrefactive microorganisms by *Bifidobacterium* sp. *Milchwissenschaft* 57: 617-62). Tan sólo se ha demostrado que algunas bifidobacterias aisladas de heces de niños producen péptidos antimicrobianos activos frente a *Listeria monocytogenes* y sólo se ha purificado una bacteriocina (Bifidocina B) de *B. bifidum* NCFB 1454, que posee un espectro de inhibición restringido a bacterias Gram-positivas (Yildirim, *et al.* 1998. Characterization and antimicrobial spectrum of Bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *J. Food Prot.* 61: 47-51; Yildirim, *et al.* 1999. Purification, amino acid sequence and mode of action of Bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *J. Appl. Microbiol.* 86: 45-54. Touré, *et al.* 2003. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 95: 1058-1069).

La presente invención aporta compuestos celulares y metabólicos con actividad antifúngica de cepas del género *Bifidobacterium*. Los compuestos resultantes del metabolismo de cepas del género *Bifidobacterium*, aportados en forma de extractos, contienen compuestos proteicos y no proteicos con actividad antifúngica y, por consiguiente, amplía las aplicaciones de este grupo microbiano en el campo de la conservación de productos destinados a alimentación humana y animal y en el área clínica y fitosanitaria. Estas bacterias son productoras de metabolitos proteicos con amplio espectro de actividad antifúngica (activos frente a levaduras y hongos). Otra ventaja de la presente invención es la resistencia de las cepas productoras a las condiciones

de estrés gastrointestinal y tecnológico que aseguran su viabilidad y estabilidad. Además, las cepas son capaces de producir los compuestos antifúngicos en condiciones intestinales y en alimentos lo que garantiza su funcionalidad y aplicaciones relacionadas con el sector agroalimentario y clínico.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Descripción breve

En la presente invención se ha detectado actividad antifúngica en el género *Bifidobacterium*. Las cepas pertenecientes a este género son productoras de compuestos de naturaleza proteica con características similares a las bacteriocinas pero con un espectro de acción que no coincide con los criterios que las definen, ya que son activos frente a hongos y levaduras. Además, las cepas producen otros compuestos estructurales y compuestos metabólicos no proteicos, con actividad antifúngica a pH ácido, que actúan de forma sinérgica con los primeros incrementando su efectividad.

La presente invención proporciona compuestos antifúngicos derivados del metabolismo de las bifidobacterias, en forma de extractos. Estos compuestos antifúngicos derivados del metabolismo de las bifidobacterias constituyen objeto de la presente invención y son reivindicados en la presente invención.

Los metabolitos son secretados al medio de cultivo durante el crecimiento de las bifidobacterias y los extractos que los contienen se obtienen a partir de los sobrenadantes libres de células de estos cultivos mediante liofilización. El espectro de actividad incluye a hongos y levaduras responsables de alteraciones en alimentos y de interés zoo- y fitosanitario por ser potencialmente patógenos o capaces de sintetizar metabolitos tóxicos pertenecientes a los géneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Hansenula*, *Hansenniaspora*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces*, etc.

Los compuestos responsables de la actividad antifúngica secretados a los medios de cultivo por las bifidobacterias y activos en los extractos neutralizados

ensayados son sustancias de naturaleza proteica y poseen características bioquímicas similares a las de las bacteriocinas de bacterias lácticas, pero no cumplen los criterios de su definición ya que inhiben a hongos y levaduras. Los compuestos responsables de la actividad antifúngica secretados a los medios de cultivo por las bifidobacterias y presentes en los extractos no neutralizados y activos a pH ácido incluyen también compuestos de distinta naturaleza, que potencian el efecto de las proteínas antifúngicas.

Los compuestos celulares y metabólicos de estas bacterias con actividad antifúngica, así como su uso como agentes antifúngicos frente a hongos y levaduras de interés zoo- y fitosanitario y alterantes de alimentos, están reivindicados en la presente invención.

Puesto que las cepas del género *Bifidobacterium* sintetizaron compuestos con actividad antifúngica de amplio espectro, en las condiciones a las que están expuestas en el tracto intestinal, pueden actuar como probióticos con función protectora a este nivel y ser utilizados con fines médicos. El uso de las cepas de la presente invención como probióticos es otro objeto de la presente invención.

Las bifidobacterias crecen y se mantienen viables en diversos alimentos constituyendo, por tanto, vehículos idóneos para su aporte.

Además, en alimentos como las leches fermentadas y no fermentadas se comprobó la capacidad de las bifidobacterias para secretar compuestos antifúngicos al medio de cultivo durante su crecimiento. Las cepas del género *Bifidobacterium*, así como sus metabolitos adicionados en forma de extractos, actúan como inhibidores del desarrollo de hongos y levaduras en alimentos. Es decir, actúan como cultivos bioprotectores en alimentos como la leche. El uso de estas cepas como agentes bioprotectores en productos agroalimentarios constituye otro objeto de la presente invención.

Descripción detallada

La presente invención proporciona componentes celulares y metabolitos antifúngicos de cepas del género *Bifidobacterium*. Los metabolitos son secretados al medio de cultivo durante el crecimiento de las bifidobacterias y

los extractos que los contienen se obtienen a partir de los sobrenadantes de estos cultivos mediante liofilización.

Las bacterias útiles en esta invención incluyen representantes del género *Bifidobacterium* de origen humano y animal, por ejemplo, cepas de las especies *Bifidobacterium longum*, *B. infantis*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. animalis*-*B. lactis* y *B. globosum*.

La actividad antimicrobiana se detecta en presencia de células y en los extractos, neutralizados (en los que se elimina el efecto de los ácidos orgánicos) y sin neutralizar (en los que el efecto de los ácidos orgánicos se suma al de los compuestos proteicos). El espectro de actividad incluye a hongos y levaduras de interés zoo- y fitosanitario y responsables de alteraciones en alimentos pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Hansenniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulaspora*, etc.

La actividad antifúngica global (de componentes celulares y productos metabólicos) de las cepas del género *Bifidobacterium* fue detectada por la técnica de la doble capa frente a representantes de un amplio número de géneros de levaduras y hongos citados con anterioridad (Ejemplo 1; Figuras 1 y 2). El espectro de inhibición fue amplio en todos los casos, pero observándose diferencias entre cepas, respecto a su intensidad (halos de inhibición entre 0 y 30 mm) y espectro de acción. La detección de actividad antifúngica debida exclusivamente a la secreción de compuestos de naturaleza proteica, se realizó mediante ensayos de inhibición de los extractos neutralizados obtenidos a partir de los cultivos de las bifidobacterias frente diversos microorganismos indicadores mediante la técnica de difusión en agar. Mediante la misma técnica, pero utilizando extractos sin neutralizar, se detectó simultáneamente la actividad de otros compuestos, como los ácidos orgánicos, activos a pH ácido. De acuerdo con los resultados obtenidos por los dos procedimientos las cepas más activas fueron *Bifidobacterium* BIR-0307, BIR-0324 y BIR-0326, pertenecientes a las especies *B. longum*, *B. infantis*, *B. catenulatum* y *B. bifidum*,

respectivamente. Estas cepas han sido reivindicadas en la patente titulada: "Extractos proteicos con amplio espectro de actividad antibacteriana y cepas del género *Bifidobacterium* que los producen" cuyo titular es Consejo Superior de Investigaciones Científicas y sus autores Collado, M.C. y Sanz, Y. que se presenta en la misma fecha que la presente solicitud. La mayoría de las hongos, incluyendo importantes productores de micotoxinas (*Alternaria alternata*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium* spp. y *Penicillium expansum*), y de levaduras fueron inhibidos por las bifidobacterias, salvo *Saccharomyces cerevisiae*. Esta excepción confiere una gran ventaja a las bifidobacterias en su aplicación como cultivos bioprotectores en productos en los que se utilice la especie *S. cerevisiae* como cultivo iniciador, ya que su adición no comprometería el éxito del proceso de fermentación.

Los compuestos metabólicos producidos por las bifidobacterias y responsables de la actividad antifúngica son sustancias de naturaleza proteica y no proteica, cuya producción o liberación al medio aumenta cuando se utiliza como medio de cultivo caldo MRS, conteniendo una concentración 4 mM de cisteína y un 1% de glicerol.

La naturaleza proteica de algunos de los compuestos responsables de la actividad antifúngica se confirma por la destrucción de la misma tras el tratamiento de extractos neutralizados con todas las proteinasas ensayadas.

La existencia de compuestos inhibidores de naturaleza no proteica, activos a pH ácido, se confirma porque parte de la actividad antifúngica se retiene en extractos no neutralizados tratados con proteasas.

Los compuestos proteicos responsables de la inhibición son termoestables manteniendo su actividad tras su incubación a 100 °C durante al menos 1 min. También son estables y activos en un amplio intervalo de pH (3-10). Por tanto, su actividad es compatible con las condiciones propias del tracto gastrointestinal y con las de un amplio número de procesos tecnológicos (fermentación y maduración de productos lácteos, cárnicos, etc.).

La masa molecular aparente de los compuestos antifúngicos es menor de 100 kDa, determinada por ultrafiltración.

Por tanto, los compuestos proteicos responsables de la actividad antimicrobiana poseen características bioquímicas similares a las de las

bacteriocinas de bacterias lácticas, pero no cumplen los criterios de su definición ya que poseen actividad antifúngica de amplio espectro, incluyendo levaduras y hongos. Así, la actividad antifúngica de los extractos frente a hongos y levaduras se destruye tras su tratamiento con diversas proteasas (tripsina, pepsina y proteinasa K). El hecho de que el espectro de inhibición incluya hongos y levaduras es una característica inusual en las bacteriocinas convencionales de bacterias Gram-positivas y en las similares ("bacteriocin-like") con actividad antifúngica identificadas hasta ahora sólo en *Lactobacillus* spp., confiriendo a este género y sus metabolitos grandes ventajas como probióticos, bioprotectores, conservantes biológicos y productos fitosanitarios biológicos.

Las cepas del género *Bifidobacterium* sintetizaron compuestos con actividad antibacteriana de amplio espectro, frente a hongos y levaduras, en las condiciones a las que están expuestas en el tracto intestinal, presencia de sales biliares (0,5-5,0 %) y pancreatina (0,1-3,0 g/l) por lo que pueden actuar como probióticos con función protectora a este nivel y ser utilizados con fines médicos.

Se determinó el posible uso de alimentos como la leche y medios basados en leche como sustrato para el crecimiento de las bifidobacterias y vehículos para su aporte en forma de células viables. En leche, todas las bifidobacterias seleccionadas e inoculadas al 1% fueron capaces de crecer, alcanzando niveles de 10^7 - 10^9 UFC/ml, tras períodos de incubación de entre 24 y 48 h. El pH de la leche se redujo de valores iniciales de 6,4 a valores entre 4,0 y 5,2 y se observó cierto grado de coagulación, especialmente importante en las muestras inoculadas con la cepa *Bifidobacterium* BIR-0324 y su aroma fue el típico del yogur. En L-EL-G, todas las bifidobacterias seleccionadas fueron capaces de crecer, y el aumento en el número de viables fue ligeramente superior (entre 1 y 0,5 unidades logarítmicas) al obtenido en L. El grado de acidificación alcanzado también fue mayor, obteniéndose valores finales de pH entre 3,0 y 4,6. Se observó también un mayor grado de coagulación y, este fue especialmente importante, en las muestras inoculadas con las cepas *Bifidobacterium* BIR-0312, BIR-0324 y BIR-0326 y su aroma fue el típico de leches fermentadas azucaradas.

Las bifidobacterias fueron capaces de sintetizar compuestos con actividad antifúngica en alimentos como la leche y medios basados en leche. La capacidad para secretar compuestos antimicrobianos al medio de cultivo durante su crecimiento en estos medios se verificó mediante ensayos de inhibición por la técnica de la doble capa (ver Figura 2.B2) y por la técnica de difusión en agar mediante el análisis de la actividad de sus extractos.

Por lo tanto, las cepas del género *Bifidobacterium* crecen y se mantienen viables en diversos alimentos constituyendo, por consiguiente, vehículos idóneos para su aporte. Las leches fermentadas y no fermentadas, constituyen ejemplos de alimentos que sirven de soporte para el mantenimiento de su viabilidad; además, se encuentran entre los productos más adecuados para la administración de cepas probióticas, debido a que la leche y sus derivados son integrantes habituales de la dieta en países desarrollados, tienen alto valor nutritivo, son fáciles de digerir y gozan de gran aceptación en los diversos grupos de población.

Las cepas del género *Bifidobacterium* pueden fermentar y coagular alimentos como la leche; por tanto, pueden ser utilizadas para la elaboración de leches fermentadas y otros derivados lácteos.

Las cepas del género *Bifidobacterium*, así como sus metabolitos adicionados en forma de extractos, actúan como inhibidores del desarrollo de hongos y levaduras en productos agroalimentarios. Las bifidobacterias actuaron, por ejemplo, como cultivos bioprotectores frente a levaduras en leche, reduciendo la viabilidad por ejemplo de *Candida parapsilosis* y *Rhodotorula glutins*, al menos, entre 1 y 3 unidades logarítmicas y en L-EL-G, al menos, entre 2 y 3 unidades logarítmicas (Figura 3). Las bifidobacterias seleccionadas actuaron como cultivos bioprotectores frente a hongos en leche reduciendo la viabilidad por ejemplo de *Penicillium* spp., al menos, una unidad logarítmica; y en L-EL-G, al menos, 2 unidades logarítmicas (Figura 3). Los efectos protectores consecuencia directa de los metabolitos secretados por las bifidobacterias, se confirmaron por adición exclusiva a la leche contaminada de sus extractos. La adición de extractos no neutralizados, en los que se sumaría los efectos de los ácidos orgánicos y los de compuestos de naturaleza proteica, y neutralizados produjeron una reducción de los niveles de *Penicillium* spp. de

al menos dos unidades logarítmicas (Figura 3). Por tanto, los compuestos de naturaleza proteica en forma de extractos así como los cultivos de las cepas del género *Bifidobacterium* que los producen pueden actuar, en alimentos como la leche, como bioprotectores inhibiendo el desarrollo de hongos y levaduras (Ejemplo 3).

El uso de los mencionados compuestos como agentes antifúngicos frente a hongos y levaduras que constituyen un riesgo zoo- y fitosanitario y que son responsables de alteraciones en alimentos, está reivindicado en la presente invención.

Otros usos de la presente invención son el uso del extracto que contiene los compuestos antifúngicos frente a hongos y levaduras alterantes de alimentos y de interés zoo- y fitosanitario y en un caso particular como conservante y fungicida biológico, y el uso del extracto como compuesto terapéutico frente a hongos y levaduras.

El uso de estas cepas como agentes bioprotectores y fungicidas biológicos de productos agroalimentarios y como probióticos con fines médicos (profilácticos o terapéuticos) constituye otro objeto de la presente invención.

DESCRIPCIONES DE LAS FIGURAS

Figura 1. Representación del espectro de actividad antifúngica de cepas del género *Bifidobacterium* mediante la técnica de la doble capa. El efecto inhibidor frente a hongos y levaduras se determinó mediante medidas de los halos de inhibición y está expresado en milímetros (mm)*. El signo (-) indica ausencia de inhibición.

Figura 2. Se muestra un ejemplo del grado de la inhibición que ejercen algunas cepas del género *Bifidobacterium* sobre el crecimiento de hongos y levaduras mediante la técnica de la doble capa. **A.** Ejemplo de la inhibición de *Bifidobacterium* BIR -0307 y BIR-0326 crecidos en MRSC sobre *Aspergillus parasiticus*. **B.** Ejemplo de la inhibición de *Bifidobacterium* BIR-0326 crecido en MRSC (B1) y en agar Leche (B2) sobre *Candida parapsilosis*.

Figura 3. Representación del efecto inhibidor de algunas bifidobacterias sobre *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula glutinis* y *Penicillium* sp. en co-cultivos en leche (L) y en leche conteniendo un 0,5 % de extracto de levadura y un 1% de

glucosa (L-EL-G) y por adición directa de los extractos, obtenidos a partir de los sobrenadantes de los cultivos de las bifidobacterias, a cultivos de los microorganismos contaminantes.

5 EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

EJEMPLO 1. PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA EN BIFIDOBACTERIAS Y DE OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CON DICHA ACTIVIDAD.

Detección de actividad antifúngica en cultivos y extractos obtenidos a partir de ellos y análisis del espectro de inhibición.

La actividad antifúngica de las cepas del género *Bifidobacterium*, se determinó mediante dos métodos: (i) por la técnica de la doble capa y (ii) por la técnica de difusión en agar.

La actividad antifúngica de cada cepa, debida a componentes celulares y metabólicos, se evaluó globalmente mediante la técnica de la doble capa utilizando como microorganismos indicadores representantes de diversos géneros de levaduras y hongos de interés sanitario y alterantes de alimentos, como los que se muestran en la Figura 1. Las bifidobacterias potencialmente activas se sembraron en placas de MRS, conteniendo un 0.05% de cisteína (MRSC) en líneas de unos 2 cm y se incubaron en condiciones óptimas durante 16 h y su desarrollo posterior se inhibió con cloroformo. Las levaduras y hongos indicadores se inocularon a una concentración de 10^4 - 10^5 células o esporas/ ml en 10 ml de agar semisólido adecuado, se vertió sobre la capa de agar del microorganismo protector y se incubó en condiciones óptimas para los indicadores. Tras 24-72 h de incubación se midieron los posibles halos de inhibición alrededor de las líneas del cultivo protector.

A fin de evaluar la actividad antifúngica debida a la secreción de compuestos de naturaleza proteica se utilizó la técnica de difusión en agar. 10 ml de caldo MRSC se inocularon al 1% con un cultivo de 24 h de cada bifidobacteria y se incubaron durante 16 h a 37°C. Los sobrenadantes se obtuvieron por centrifugación (12.000 g, 15 min, 4°C) y se concentraron por liofilización. Los líofilos se resuspendieron en 1 ml de tampón fosfato 50 mM a pH 6,5, se neutralizaron con NaOH hasta alcanzar un pH de 6,5 para eliminar

los efectos de los ácidos orgánicos generados por fermentación, y se esterilizaron por filtración. Estas muestras constituyeron los extractos crudos en los que se determinó la posible actividad de proteínas antibacterianas producidas por las bifidobacterias. El microorganismo indicador se inoculó a una concentración de 10^4 - 10^5 células o esporas/ml en 10 ml de agar semisólido adecuado y se vertió sobre una capa sólida de agar del mismo medio. Tras solidificar, se perforaron pocillos de 5 mm, a los que se añadieron 40 μ l del extracto neutralizado de cada bifidobacteria. Se dejó difundir 1 h a 4°C y, posteriormente, se incubó en las condiciones óptimas para cada microorganismo indicador. Como microorganismos indicadores, se utilizaron varios hongos (*Fusarium* spp. y *Penicillium* sp.) y levaduras (*Candida* spp.).

En ambos casos, para el crecimiento de levaduras se utilizó agar extracto de levadura (Scharlau, Barcelona) y se incubó en aerobiosis a 30°C, excepto en el caso de *Cryptococcus albidus* que se incubó a 26 °C. Para el crecimiento de hongos se utilizó agar Extracto de Malta (Scharlau, Barcelona) y se incubó en aerobiosis a 26 °C.

Caracterización de los compuestos responsables de la actividad antifúngica

La caracterización de los compuestos metabólicos responsables de la actividad antifúngica de los extractos neutralizados y no neutralizados, obtenidos por el procedimiento descrito en el apartado anterior, se realizó mediante los siguientes ensayos:

- (i) Sensibilidad a diversas enzimas proteolíticas (tripsina, proteinasa K y pepsina, suministrados por Sigma (St. Louis, MO)). Los extractos se incubaron en presencia de 2 mg/ml de cada enzima y fueron incubados en condiciones óptimas de actuación para cada una de ellas, durante 2 h. Tras cada tratamiento se determinó la actividad residual utilizando como control los extractos incubados en ausencia de enzimas.
- (ii) Estabilidad a la temperatura y pH. Los extractos se incubaron a distintas temperaturas (80 y 100 °C) durante 10-30 min y a distintos pH (3-10), durante 1 h. Tras cada tratamiento se determinó la actividad residual utilizando controles no tratados.

- (iii) Masa molecular aparente. Se determinó mediante el uso de sistemas de filtración-centrifugación (Millipore, Bedford, Mass) con membranas de límites de exclusión entre 3 y 100 kDa. Los extractos se fraccionaron de forma progresiva con filtros de distinto límite de exclusión y se determinó en que fracciones (retenido y filtrado) se concentraba la actividad.

Como microorganismos indicadores se utilizaron levaduras (*Candida* spp.) y hongos (*Fusarium* spp. y *Penicillium* spp.).

10 EJEMPLO 2. FUNCIÓN BIOPROTECTORA DE LAS CEPAS DEL GÉNERO *BIFIDOBACTERIUM* Y DE SUS EXTRACTOS EN ALIMENTOS.

Se utilizó leche descremada al 10% como modelo de un alimento en el que las cepas seleccionadas podrían desempeñar una función bioprotectora frente a levaduras y hongos alterantes o de riesgo para la salud. La leche, previamente esterilizada, se inoculó con las bifidobacterias bioprotectoras, de modo que alcanzarán niveles de 10^7 UFC/ml, y se contaminaron con cultivos de *Cándida parapsilosis*, *Rhodotorula glutinis*, y *Penicillium* sp. de modo que alcanzaran niveles finales de 10^4 - 10^5 UFC/ml, y se incubaron a 37 °C, durante 24-48 h. Paralelamente, se analizaron controles en los que sólo se inoculó el hongo o levadura contaminante. A distintos tiempos se tomaron alícuotas y se evaluó comparativamente la viabilidad de los microorganismos contaminantes en presencia o ausencia de la bifidobacteria bioprotectora. Los recuentos de levaduras y hongos se realizaron en agar Rosa de Bengala (Scharlau, Barcelona, España) incubando en aerobiosis a 30°C, durante 48-72 h.

A fin de estudiar el efecto bioprotector de los compuestos antimicrobianos secretados al medio por las bifidobacterias durante su crecimiento en medios que constituyen modelos de alimentos como L y L-EL-G, 0,2 volúmenes de los extractos correspondientes, neutralizados y sin neutralizar, se adicionaron a la leche previamente inoculada con el microorganismo contaminante (*Penicillium* sp. 10^4 UFC/ml). Se incubó a 37 °C durante 48 h y se analizó la viabilidad a distintos tiempos mediante recuentos en placa. Paralelamente, se analizaron controles en los que se inoculó la bacteria contaminante y un volumen equivalente de medio no fermentado.

REIVINDICACIONES

1. Compuestos con actividad antifúngica caracterizados porque:
 - a) están producidos por el género *Bifidobacterium*,
 - b) son componentes celulares y metabólicos de las bifidobacterias
 - 5 c) los componentes metabólicos son secretados al medio y obtenidos en forma de extractos.
 - d) los componentes metabólicos son de naturaleza proteica y no proteica
2. Compuestos con actividad antifúngica según las reivindicación 1
10 caracterizados porque los compuestos proteicos:
 - a) tienen una masa molecular aparente menor de 100 kDa
 - b) son termoestables
 - c) presentan estabilidad y actividad en un intervalo de pH de 3-10
 - d) son sensibles a enzimas proteolíticas
- 15 3. Compuestos con actividad antifúngica según la reivindicación 1 caracterizados porque los compuestos no proteicos son activos a pH ácido.
4. Compuestos con actividad antifúngica según las reivindicaciones de la 1 a la 3 caracterizados porque son producidos por cepas de, entre otras,
20 las especies, *Bifidobacterium longum*, *B. infantis*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. animalis/lactis* y *B. globosum*.
5. Compuestos con actividad antifúngica según las reivindicaciones de la 1 a la 4 caracterizados porque están producidos por las cepas
25 *Bifidobacterium* BIR-0304, BIR-0307, BIR-0312, BIR-0324, BIR-0326 y BIR-0349.
6. Uso de los compuestos según las reivindicaciones de la 1 a la 5 como agentes antifúngicos frente a hongos y levaduras alterantes y de interés fito- y zosanitario.
- 30 7. Uso de los compuestos según la reivindicación 6 como conservante biológico o fungicida en productos agroalimentarios frente a hongos y levaduras alterantes y patógenos de vegetales y animales.

8. Uso de los compuestos según la reivindicación 6 como agente terapéutico frente a hongos y levaduras.
9. Uso del extracto que contiene los compuestos de las reivindicaciones de la 1 a la 5 frente a hongos y levaduras alterantes y de interés fito- y zoosanitario.
10. Uso del extracto según la reivindicación 9 como conservante biológico o fungicida en productos agroalimentarios frente a hongos y levaduras alterantes y patógenos de vegetales y animales.
11. Uso del extracto según la reivindicación 9 como compuesto terapéutico frente a hongos y levaduras.
12. Uso de los microorganismos productores de los compuestos activos frente a hongos y levaduras de las reivindicaciones de la 1 a la 5 como agentes antifúngicos frente a hongos y levaduras alterantes y de interés fito- y zoosanitario.
13. Uso de los microorganismos productores de los compuestos según la reivindicación 12 como conservantes biológicos y fungicidas en productos agroalimentarios frente a hongos y levaduras alterantes y patógenos de vegetales y animales.
14. Uso de los microorganismos productores de los compuestos según la reivindicación 12 como probióticos frente a hongos y levaduras con fines médicos (profilácticos o terapéuticos).

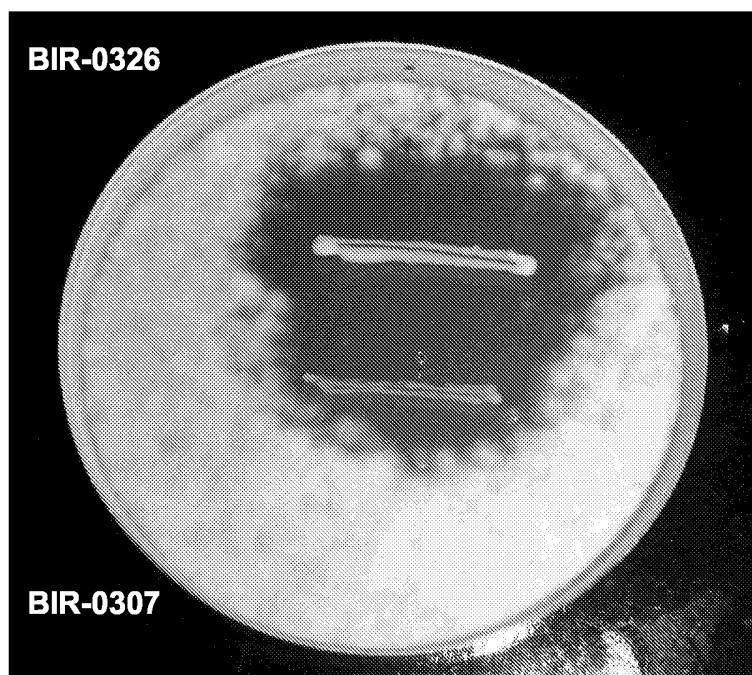
FIGURA 1

Indicador	Espectro de inhibición (mm)* de las cepas <i>Bifidobacterium</i>					
Hongos	BIR-0304	BIR-0307	BIR-0312	BIR-0324	BIR-0326	BIR-0349
<i>Alternaria alternata</i>	11	3	-	20	5	-
<i>Aspergillus parasiticus</i>	11	12	15	15	20	13
<i>Cladosp. cladosporoides</i>	10	12	20	22	20	20
<i>Fusarium graminearum</i>	12	25	20	14	15	16
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	16	24	20	18	25	20
<i>Penicillium expansum</i>	5	15	20	11	13	12
<i>Penicillium sp.</i>	15	15	18	20	19	15
<i>Trichoderma koningii</i>	14	2	12	10	12	9
Levaduras						
<i>Candida albicans</i>	5	-	10	6	11	-
<i>Candida parapsilosis</i>	15	7	8	18	15	12
<i>Cryptococcus albidus</i>	23	10	22	22	20	15
<i>Debaryomyces</i>	20	10	18	13	20	6
<i>Dekkera bruxellensis</i>	11	4	12	10	13	4
<i>Hansenias.</i>	7	4	10	10	11	-
<i>Kloeckera apiculata</i>	14	-	20	16	12	15
<i>Kluyveromyces lactis</i>	17	-	10	11	11	14
<i>Pichia guilliermondii</i>	10	-	15	9	10	-
<i>Rhodotorula glutinis</i>	24	16	28	28	24	30
<i>Saccharomyces</i>	-	-	-	4	-	-

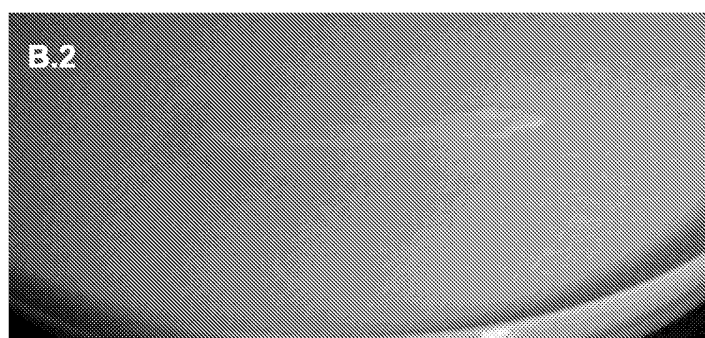
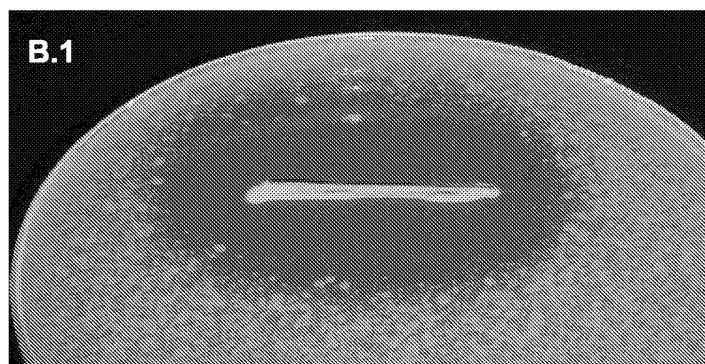
2/3

FIGURA 2

A



B.



3/3

FIGURA 3

Alimento modelo	Viabilidad del microorganismo contaminante (UFC/ml)		
	Tiempo de Incubación (h)		
Leche inoculada	0 h	24	48 h
<i>C. parapsilosis</i>	$1,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	-
<i>C. parapsilosis</i> + <i>Bifidobacterium</i> BIR-0326	$1,0 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$	-
<i>R. glutinis</i>	$3,3 \times 10^4$	$2,4 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$
<i>R. glutinis</i> + <i>Bifidobacterium</i> BIR-0324	$3,3 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	$<10^2$
<i>Penicillium</i> sp.	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
<i>Penicillium</i> sp.+ <i>Bifidobacterium</i> BIR-0324	$1,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$
<i>Penicillium</i> sp.+ extracto LELG sin fermentar	$1,0 \times 10^4$	$6,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^5$
<i>Penicillium</i> sp.+extracto LELG sin neutralizar de <i>Bifidobacterium</i> BIR-0324	$1,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3$	$6,0 \times 10^3$
<i>Penicillium</i> sp.+extracto LELG neutralizado de <i>Bifidobacterium</i> BIR-0324	$1,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$
Leche-Extracto Levadura-Glucosa (LELG) inoculada			
<i>C. parapsilosis</i>	$1,9 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$
<i>C. parapsilosis</i> + <i>Bifidobacterium</i> BIR-0326	$1,9 \times 10^5$	$4,9 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$
<i>R. glutinis</i>	$3,3 \times 10^4$	$2,2 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$
<i>R. glutinis</i> + <i>Bifidobacterium</i> BIR-0324	$3,3 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$<10^2$
<i>Penicillium</i> sp.	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$
<i>Penicillium</i> sp.+ <i>Bifidobacterium</i> BIR-0324	$1,0 \times 10^4$	$<10^2$	$<10^2$