



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 318 050**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

A23K 3/00 (2006.01)

A23L 3/3571 (2006.01)

C12R 1/245 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **02777697 .0**

(96) Fecha de presentación : **30.10.2002**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1442113**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **04.08.2004**

(54) Título: **Mezcla de *Propionibacterium jensenii* y *Lactobacillus* sp. con actividades antimicrobianas para su utilización como sistema de conservación natural.**

(30) Prioridad: **06.11.2001 EP 01125464**

(73) Titular/es:
**Eidgenössische Technische Hochschule Zürich
Rämistrasse 101
8092 Zürich, CH**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

(72) Inventor/es: **Miescher Schwenninger, Susanne y
Meile, Leo**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Mezcla de *Propionibacterium jensenii* y *Lastobacillus* sp. con actividades antimicrobianas para su utilización como sistema de conservación natural.

Referencias cruzadas a las solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea nº 01 125 464.6, presentada el 6 de noviembre de 2001.

Campo técnico

La invención se refiere a bacterias adecuadas para la conservación de artículos, en particular a una mezcla de bacterias según la reivindicación 1. Además, la invención se refiere a alimento, a producto alimenticio o a un medicamento según la reivindicación 11 que comprende dicha mezcla, a un procedimiento para la preparación de dicho alimento, producto alimenticio o medicamento según la reivindicación 13, a un procedimiento para el almacenamiento de dicho alimento, producto alimenticio o medicamento según la reivindicación 16 y a la utilización de dicha mezcla según la reivindicación 17.

Antecedentes de la técnica

La excrecencia de los microorganismos indeseados en los productos alimenticios puede contrarrestarse de diferentes maneras. Además de los tratamientos físicos y químicos, se utilizan extensamente los tratamientos biológicos tales como fermentaciones por microorganismos residentes naturales y/o artificiales ("iniciadores"). Éstos pueden cambiar las condiciones del alimento en las que el crecimiento de organismos no deseados es menos favorable o está completamente inhibido como es el caso en el vino, cerveza, queso o yogur (Holzapffel *et al.* 1995; Vogel, 1996). Otro sistema de conservación de alimentos provocada biológicamente es el enriquecimiento de "cultivos protectores" que actúan como "bioconservantes". Dichos cultivos están concebidos

- a) para desarrollar y suprimir completamente los organismos indeseados
- b) o para desarrollar y producir agentes antimicrobianos y antimicóticos (por ejemplo bacteriocinas, ácidos orgánicos, diacetil, metabolitos desconocidos)
- c) o para interactuar por mecanismos desconocidos con microorganismos que estropean los alimentos.

Dado que los cultivos protectores generalmente no participan en procesos de modificación de alimentos específicos como cultivos iniciadores, su aplicación puede también extenderse a materiales que no son alimentos.

Las actividades antimicrobianas de las propionibacterias y las bacterias del ácido láctico las hacen apropiadas para su aplicación industrial como bioconservantes. Bio Profit (Valio Ltd., Helsinki, Finlandia; Wiesby GmbH & Co., Niebüll, Alemania), es un cultivo conjunto disponible en el mercado de *Lactobacillus rhamnosus* LC705 (DSM 7061) (*Lactobacillus casei* subesp. *rhamnosus* anterior) y *Propionibacterium freudenreichii* subesp. *shermanii* JS (DSM 7067), que se sugiere para un control de levaduras y mohos (Soumalainen y Mäyrä-Mäkinen, 1999). Ambos organismos se han cultivado conjuntamente y se supone que se utilizan como una célula que contiene caldo de fermentación que inhibe el crecimiento de mohos y levaduras en los alimentos. La cepa *Lactobacillus rhamnosus* LC705 fue protegida en 1993 mediante una patente europea (EP 0 576 780) para ser utilizada como una cepa individual o en combinación con una bacteria del género *Propionibacterium* u otra cepa de la especie bacteriana *Lactobacillus casei*. Una segunda patente alemana (DE 199 17 715) describe cultivos protectores constituidos por bacterias de ácido láctico y que inhiben el crecimiento de bacterias tóxicas a temperaturas superiores a 7 a 8°C. Los cultivos se sugieren para la conservación de alimentos y de alimentos animales (producto alimenticio) presentando solamente un periodo de conservación corto inferior a 7 a 8°C. Tan pronto como la temperatura de almacenamiento aumenta, los cultivos no cumplen con la inhibición del crecimiento de bacterias de descomposición. En contraposición, Microgard™ (Wesman Foods, Inc., Beaverton, Oregón, EUA) es un producto lácteo disponible en el mercado, fermentado por una cepa de *P. freudenreichii* subesp. *shermanii*, seguido de un proceso de pasteurización. El producto cumple la eficacia en la inhibición de organismos degradadores de alimentos seleccionados así como los microorganismos patógenos que es conocido que producen enfermedades transmitidas por alimentos (Daeschel, 1989; Al-Zoreky *et al.*, 1991). Microgard™ está aprobado por la U.S. Food and Drug Administration.

Exposición de la invención

Por lo tanto, un objetivo general de la invención consiste en proporcionar un inhibidor a base de bacterias mejoradas para el desarrollo de hongos (levaduras, mohos) y/o bacterias así como una mezcla de los mismos.

Actualmente, con el fin de desarrollar este y otros objetivos de la invención, que resultarán más evidentes como procedimientos de descripción, la invención se pone de manifiesto a partir de las propiedades que se mencionan en cada una las reivindicaciones independientes.

Se descubrió de manera inesperada que las bacterias seleccionadas de la especie *Propionibacterium jensenii* y/o el género *Lactobacillus* que son cultivos no iniciadores y exentos de metabolismos son inhibidores adecuados de microorganismos no deseados. En particular una mezcla de bacterias (denominada también mezcla inhibidora o cultivo de protección) -que es un cultivo no iniciador- y que está exento de metabolismos y que comprende por lo menos una primera bacteria seleccionada de la especie *Propionibacterium jensenii* y por lo menos una segunda bacteria seleccionada del género *Lactobacillus*, es capaz de inhibir por lo menos un microorganismo seleccionado de entre hongos y/o bacterias así como mezclas de hongos y bacterias que por ejemplo son responsables del deterioro de alimentos y productos alimenticios.

Esta mezcla de bacterias presenta la gran ventaja de que -aunque los metabolismos que hasta ahora se dice que son responsables de la actividad protectora están ausentes- la protección es tan buena o incluso mejor que con los cultivos conocidos hasta ahora y los efectos secundarios no deseados debidos a los metabolitos (por ejemplo los metabolitos pueden ser tóxicos o también influir negativamente en el sabor, color del alimento, etc.) se han reducido notablemente o incluso se han eliminado completamente.

La mezcla de bacterias se incorpora en la superficie del artículo y/o se aplica sobre la misma para protegerlo.

El término “metabolitos” comprende todos los productos que se originan en el metabolismo de las bacterias comprendidas por la mezcla.

En la presente solicitud, las bacterias y los hongos que pueden deteriorar los alimentos, los productos alimenticios o los medicamentos se denominan también “microorganismos no deseados”.

La expresión “mezcla de bacterias exenta de metabolitos” significa que solamente la mezcla de bacterias (por ejemplo separadas de los metabolitos por lo menos por centrifugación, preferentemente por centrifugación y por lo menos una etapa de lavado), opcionalmente junto con un vehículo, se incorpora en y/o se aplica sobre la superficie del artículo (alimento, producto alimenticio o medicamento) que va a ser protegido del deterioro.

Además, en relación con la presente solicitud de patente, la expresión “que va a inhibirse, inhibir, etc.”, significa por ejemplo que el crecimiento o también el número o la concentración de microorganismos no deseados, por ejemplo en el alimento y/o sobre la superficie del alimento que comprende la mezcla, es inferior a la del alimento y/o sobre la superficie del alimento que no comprende dicha mezcla.

La expresión “mezcla que es un cultivo no iniciador” significa una mezcla que comprende bacterias que no se adaptan o no están adaptadas esencialmente al artículo (en particular alimento, producto alimenticio o medicamento) que va a ser protegido por la mezcla de modo que no se desarrollan o solamente se desarrollan mínimamente. Crecimiento mínimo significa un crecimiento de hasta como mucho aproximadamente diez veces.

Una mezcla preferida es una mezcla de bacterias como la descrita anteriormente que puede obtenerse por el procedimiento que comprende las etapas siguientes:

En primer lugar, una mezcla inhibidora que comprende por lo menos una primera y por lo menos una segunda bacteria y cuya mezcla está exenta de metabolitos se incorpora en un medio y/o se aplica sobre la superficie de un medio contenido en un primer recipiente de modo que resulta una concentración mínima como la definida con mayor detalle a continuación de cada uno de dichas por lo menos primera y por lo menos segunda bacterias en este medio y/o sobre la superficie de este medio.

El medio contenido en los primer y segundo recipientes (el segundo recipiente se describe a continuación) en o sobre el que se prueba la inhibición de los contaminantes preferentemente es alimento, producto alimenticio o medicamento o muy preferentemente medio de agar-agar sólido.

Por lo menos una primera bacteria se selecciona de entre la especie *Propionibacterium jensenii* y por lo menos una segunda bacteria se selecciona de entre el género *Lactobacillus*.

Como blanco, se prepara un segundo recipiente que comprende el mismo medio y dicho primer recipiente pero ninguna mezcla de bacterias.

A continuación se incorporan el mismo número de contaminantes en el medio y/o se aplican sobre la superficie del medio contenido en dichos primer y segundo recipientes.

El término “contaminantes” es igual a la expresión “microorganismos no deseados” y comprende hongos y/o bacterias así como mezclas de hongos y bacterias.

El efecto inhibidor de la mezcla contra los contaminantes se determina almacenando los primer y segundo recipientes a una temperatura adecuada durante un tiempo de almacenamiento adecuado.

En general, dicha temperatura adecuada a la cual se realiza este procedimiento depende de la temperatura a la que normalmente se almacena y/o se prepara un artículo específico, en particular alimento, producto alimenticio o medicamento.

ES 2 318 050 T3

La temperatura a la que normalmente se almacenan los primer y segundo recipientes es de 5 a 26°C, preferentemente dicha temperatura se selecciona por lo menos de entre el grupo de aprox. 6°C y/o aprox. 12°C y/o aprox. 25°C.

5 El término “aprox.” significa $6 \pm 1^\circ\text{C}$, $12 \pm 1^\circ\text{C}$, $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

El tiempo de almacenamiento a dicha temperatura depende del tiempo durante el que el artículo (alimento, producto alimenticio o medicamento) se almacena normalmente.

10 El tiempo de almacenamiento normalmente es de 7 a 28 días, preferentemente dicho tiempo de almacenamiento se selecciona por lo menos de entre el grupo de 7 días y/o 14 días y/o 21 días y/o 28 días.

15 Durante dicho periodo de almacenamiento a una temperatura específica, se compara el número o la concentración de contaminantes incorporados en el medio y/o aplicados sobre la superficie del medio contenido en los primer y segundo recipientes.

Basándose en esta comparación (número/concentración de contaminantes en dicho primer recipiente en un periodo específico frente al número/concentración de contaminantes en dicho segundo recipiente en este periodo específico), un primer y un segundo gráfico pueden dibujarse en un sistema de coordenadas en el que por ejemplo el eje x representa el periodo de almacenamiento y el eje y representa el número y/o la concentración de contaminantes. El primer gráfico presenta el número o concentración de contaminantes incorporados en el medio y/o aplicados sobre la superficie del medio en el primer recipiente y el segundo gráfico presenta la misma medición en el medio y/o en la superficie del medio contenido en el segundo recipiente.

25 Si se investigaran solamente cepas individuales o mezclas de cepas de la misma especie o género, podría utilizarse por consiguiente el procedimiento mencionado anteriormente.

La mezcla se considera que se inhibe durante las etapas del periodo de almacenamiento, si dicho segundo gráfico es dicho primer gráfico anterior.

30 Preferentemente, se considera que la mezcla se inhibe si el número de contaminantes en el medio y/o en la superficie del medio contenido en el segundo recipiente es por lo menos aproximadamente superior a log 1, preferentemente por lo menos de aproximadamente log 2, muy preferentemente por lo menos de aproximadamente log 3, más preferentemente por lo menos de aproximadamente log 4, incluso más preferentemente por lo menos de aproximadamente log 5, aún más preferentemente por lo menos de aproximadamente log 6 que el número de contaminantes en el medio y/o en la superficie del medio contenido en dicho primer recipiente durante por lo menos 3 días, preferentemente por lo menos 7 días, muy preferentemente por lo menos 14 días, más preferentemente por lo menos 21 días y aún más preferentemente 25 días.

40 Según una forma de realización preferida de la invención, por lo menos una primera bacteria mencionada anteriormente es *Propionibacterium jensenii* SM11.

Según otra forma de realización preferida de la invención, por lo menos una segunda bacteria mencionada anteriormente se selecciona de entre el grupo constituido por *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* y mezclas de las mismas.

45 Según otra forma de realización, más preferida de la invención, por lo menos la segunda bacteria se selecciona de una o más cepas de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei*.

50 Según una forma de realización aún más preferida de la invención, por lo menos una segunda bacteria es *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM20 y/o *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM29 y/o *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM63 y mezclas de las mismas.

55 La proporción entre por lo menos una primera bacteria y por lo menos una segunda bacteria de la mezcla (por ejemplo la proporción de la concentración o número de por lo menos la primera bacteria y la concentración o número de por lo menos una segunda bacteria) preferentemente asciende entre 1:100 y 100:1, preferentemente entre 1:10 y 10:1.

60 Las mezclas descritas anteriormente proporcionan la ventaja de que los microorganismos seleccionados de entre el grupo constituido por hongos, bacterias y mezclas de hongos y bacterias que son o pueden ser patógenos para los seres humanos y/o los animales y/o que tienen o pueden tener un efecto de descomposición (por ejemplo un alimento, un producto alimenticio o medicamentos) puede ser inhibido.

65 Por ejemplo en el caso de alimento (los medios de conservación tales como los procedimientos químicos (por ejemplo la aplicación de conservantes de alimentos, salazón) y/o los procedimientos físicos (por ejemplo, calor, rayos UV, rayos gamma, rayos X), envasado utilizando gases protectores (por ejemplo N₂, CO₂ o envasado al vacío pueden reducirse u omitirse totalmente sin reducción del periodo de almacenamiento/periodo de conservación del alimento.

ES 2 318 050 T3

Como consecuencia de esto, especialmente el alimento poco procesado o también los ingredientes poco procesados que por ejemplo se añaden al alimento muy procesado pueden almacenarse durante un periodo más prolongado sin deterioro biológico o pueden también ser mejor exportados a otros países.

- 5 Si se desea, la mezcla puede utilizarse también junto con los procedimientos de conservación mencionados anteriormente.

La utilización de dichos procedimientos de conservación en combinación con la mezcla, es un requisito previo para que la mezcla pueda todavía realizar su finalidad protectora.

10 Esto significa por ejemplo que después de la aplicación de dicho procedimiento de conservación, el artículo que debe protegerse todavía tiene que cumplir por lo menos las concentraciones mínimas siguientes de células viables (cfu = unidad formadora de colonias).

15 La concentración mínima de por lo menos una primera o por lo menos una segunda bacteria en el alimento desde el punto de vista de la protección asciende a por lo menos 1×10^7 cfu/ml, preferentemente por lo menos a aproximadamente 1×10^8 cfu/ml, aún más preferentemente por lo menos a aproximadamente 1×10^9 cfu/ml o por lo menos a aproximadamente 1×10^7 cfu/g, preferentemente por lo menos a aproximadamente 1×10^8 cfu/g, aún más preferentemente por lo menos a aproximadamente 1×10^9 cfu/ml y/o en la superficie del alimento por lo menos a aproximadamente 1×10^6 cfu/cm², preferentemente por lo menos a aproximadamente 1×10^7 cfu/cm², muy preferentemente por lo menos a aproximadamente 1×10^8 cfu/cm², aún más preferentemente por lo menos a aproximadamente 1×10^9 cfu/cm².

25 Si se desea una actividad mayor frente a los contaminantes, son posibles concentraciones de por lo menos aproximadamente 1×10^{10} cfu/ml o por lo menos aproximadamente 1×10^{10} cfu/g y/o por lo menos aproximadamente 1×10^{10} cfu/cm².

30 Las concentraciones mínimas mencionadas anteriormente se apartan de la observación experimental que consiste en que cuanto mayor es la concentración o el número de cultivo protector, mayor es la inhibición de los hongos y/o las bacterias así como de las mezclas de los mismos.

Aunque se observa ya alguna protección si la primera y la segunda bacteria están presentes en cantidades de 1×10^7 cfu/ml o cfu/g, la protección es mucho mejor si por lo menos una primera bacteria y por lo menos una segunda bacteria combinadas entre sí con la mezcla de bacterias suponen por lo menos aproximadamente 5×10^7 cfu/ml o por lo menos aproximadamente 5×10^7 cfu/g y/o por lo menos aproximadamente 5×10^6 cfu/cm² para por lo menos una primera bacteria y por lo menos aproximadamente 1×10^8 cfu/ml o por lo menos aproximadamente 1×10^8 cfu/g y/o por lo menos aproximadamente 1×10^7 cfu/cm² para por lo menos una segunda bacteria. Se consiguieron resultados muy satisfactorios con por lo menos aproximadamente 1×10^8 cfu/ml o por lo menos aproximadamente 1×10^8 cfu/g y/o por lo menos aproximadamente 1×10^7 cm² para por lo menos una primera bacteria y por lo menos aproximadamente 1×10^8 cfu/ml o por lo menos aproximadamente 1×10^8 cfu/g y/o por lo menos aproximadamente 1×10^7 cm² para por lo menos una segunda bacteria. Actualmente resultan preferidos por lo menos aproximadamente 5×10^8 cfu/ml o por lo menos 5×10^8 cfu/g y/o por lo menos aproximadamente 5×10^7 cfu/cm² para por lo menos una primera bacteria y por lo menos aproximadamente 5×10^8 cfu/ml o por lo menos aproximadamente 5×10^8 cfu/g y/o por lo menos aproximadamente 5×10^7 cfu/cm² para por lo menos una segunda bacteria.

45 Las concentraciones mínimas y las concentraciones preferidas mencionadas anteriormente se aplican también a medicamentos y productos alimenticios.

La determinación de la concentración en la superficie puede realizarse por dos procedimientos:

- 50 (i) midiendo la cantidad aplicada, por ejemplo en aplicación por atomización, o preferentemente
- (ii) midiendo la concentración de un volumen específico con la superficie de aplicación bien definida y que comprende la zona de difusión global de la mezcla de bacterias.

55 La expresión “por lo menos una bacteria de 1×10^7 cfu/ml” significa que una primera bacteria y opcionalmente una u otra primera bacteria más que son diferentes entre sí y que pertenecen todas al género *Propionibacterium jensenii* están presentes simultáneamente, por lo que todas las primeras bacterias conjuntamente forman una concentración de 1×10^7 cfu/ml. Esta definición se aplica también a atenuaciones equivalentes en la solicitud.

60 Las concentraciones mínimas definidas anteriormente han de darse en cualquier etapa después de la terminación del proceso de preparación del alimento, producto alimenticio o medicamento.

65 En cualquier caso, la concentración de la mezcla debe ser superior o por lo menos igual a la concentración mínima antes del comienzo del almacenamiento.

Preferentemente, el alimento, el producto alimenticio o los medicamentos comprenden una concentración tal de las bacterias de la mezcla que la concentración de bacterias y/o hongos o la mezcla de bacterias y hongos se mantiene

ES 2 318 050 T3

por debajo de los requisitos mencionados en la reglamentación de alimentos del respectivo país en el que se utiliza la invención.

5 Preferentemente, pero no necesariamente, estas concentraciones mínimas se aplican también durante la realización del procedimiento de preparación.

10 Si la concentración de bacterias de la mezcla en el artículo y/o en la superficie del artículo que debe protegerse cae por debajo de la concentración mínima durante la realización del procedimiento de preparación a causa por ejemplo de la aplicación de procedimientos de conservación que reducen las células viables (calor, rayos UV, etc.) o como consecuencia de los cambios de concentración durante la preparación (por ejemplo por adición de más ingredientes, etc.) pueden añadirse células durante la realización de la preparación. En el caso del procedimiento de preparación que comprende una etapa de larga duración, es importante que la concentración mínima esté ya presente durante dicha etapa, tal como, por ejemplo durante la maduración de las salchichas.

15 Si tiene lugar una reducción de la concentración de las células viables durante el almacenamiento de modo que la concentración mínima requerida ya no se da más, tienen que añadirse células viables adicionales si es posible.

20 En general, la concentración de la mezcla de bacterias en el alimento, el producto alimenticio y los medicamentos puede ser superior a las concentraciones mínimas mencionadas anteriormente. Pero las concentraciones han de seleccionarse de modo que el alimento, el producto alimenticio o el medicamento no esté afectado por deterioros no deseados. Esto significa por ejemplo que la mezcla no influye en las propiedades organolépticas o en otras calidades del alimento (por ejemplo decoloración, etc.).

25 Además de las mezclas descritas anteriormente, la invención proporciona asimismo un procedimiento para la preparación por ejemplo del producto alimenticio, de los medicamentos, y preferentemente del alimento, que comprende dichas mezclas.

El procedimiento de preparación permite que no puedan desarrollarse los microorganismos no deseados.

30 A continuación, el procedimiento se describe por medio de alimento, pero no excluye que lo que se da a conocer a continuación pueda también ser aplicado a la preparación, de otros artículos, por ejemplo, producto alimenticio y medicamentos.

35 El procedimiento comprende las etapas siguientes: En primer lugar, la mezcla se añade durante la preparación del alimento en una cantidad tal que la concentración de por lo menos una primera bacteria y por lo menos una segunda bacteria en cada alimento asciende por lo menos a la concentración mínima cfu/ml o cfu/g del alimento y/o por lo menos a la concentración mínima cfu/cm² de la superficie del alimento.

40 En general, la mezcla ha de añadirse en la etapa del procedimiento de preparación o antes del almacenamiento de modo que pueda distribuirse uniformemente en el artículo y/o en la superficie del artículo que debe protegerse.

La mezcla preferentemente se aplica en una etapa antes de una contaminación significativa con microorganismos no deseados.

45 En una segunda etapa de la preparación, por ejemplo después de la adición de la mezcla, uno o más parámetros del procedimiento de preparación han de controlarse de modo que la concentración de la mezcla disminuye o, preferentemente permanece constante. Aunque la disminución en la concentración puede “solucionarse” tal como se describió anteriormente, debe evitarse el crecimiento significativo.

50 Dichos parámetros son por ejemplo la temperatura, la presión o también los ingredientes del alimento, etc.

55 Por el término “constante” se entiende (una vez la mezcla se añade al artículo, por ejemplo alimento o producto alimenticio o medicamento) que la concentración de la mezcla permanece constante. Dicha mezcla constante preferentemente se añade en una cantidad tal que se produce por lo menos la concentración mínima definida en la presente solicitud. Por el término “constante”, se entiende también un aumento del número o de la concentración de bacterias de la mezcla mediante el crecimiento de las bacterias hasta como mucho diez veces.

60 En caso de que el procedimiento de preparación comprenda una o más etapas de fermentación, la mezcla (si se añade antes de la fermentación) no debe tener una influencia negativa en los microorganismos (por ejemplo bacterias, mohos, levaduras o mezclas de los mismos) responsable de una o más de dichas fermentaciones (por ejemplo reducción de la actividad de fermentación).

Si la mezcla presenta dicha influencia negativa en estos microorganismos, la mezcla se añade después de una o más de dichas etapas de fermentación críticas o después de la terminación del procedimiento de preparación.

65 Asimismo en los procedimientos de preparación que comprenden etapas que pueden ser afectadas por la mezcla de bacterias, dichas bacterias se añaden después de una o más de dichas etapas.

Además, la invención proporciona un procedimiento para el almacenamiento de artículos, en particular de productos alimenticios, medicamentos y preferentemente alimentos en los que el desarrollo de microorganismos no deseados está inhibido durante el almacenamiento.

5 Este procedimiento de almacenamiento puede utilizarse para el almacenamiento de por ejemplo alimentos, productos alimenticios o medicamentos que se preparan según el procedimiento de preparación de la invención o por procedimientos de preparación conocidos.

10 Solamente durante el procedimiento de preparación según la invención, el parámetro o parámetros del procedimiento de preparación se controlan de modo que la concentración de la mezcla permanece constante.

Utilizando por ejemplo otros procedimientos de preparación habituales, no existe ningún control o solamente un control parcial. Por consiguiente, la mezcla debería añadirse en dicho procedimiento de preparación en una etapa después de la cual la concentración de la mezcla permanece constante.

15 El procedimiento de almacenamiento comprende la etapa de control del parámetro de almacenamiento o de los parámetros de almacenamiento durante el almacenamiento de modo que la concentración de por lo menos la primera y por lo menos una segunda bacteria permanece constante.

20 Los parámetros de almacenamiento posibles son por ejemplo la temperatura, la atmósfera de almacenamiento en torno al artículo, la atmósfera de almacenamiento dentro del envase del artículo, etc.

El término “almacenamiento” significa el periodo después de la terminación de la preparación del artículo, por ejemplo del alimento, producto alimenticio o medicamento y por consiguiente dicho término por ejemplo puede también comprender el transporte.

La mezcla de bacterias según la invención preferentemente está contenida en la superficie del alimento, producto alimenticio o medicamentos y/o aplicada sobre la misma.

30 Dichos alimentos preferentemente son productos lácteos, más preferentemente productos lácteos agrios.

Además, resultan asimismo preferidos la carne y los productos cárnicos.

35 Los productos lácteos son por ejemplo leche entera, leche tratada térmicamente o microfiltrada, mantequilla, leche cuajada, crema agria, leche desnatada, crema, yogur, suero de leche, cuajada, queso, kéfir, kumiss, pudín, leche agria, leche agria con *acidophilus*, langfil (leche viscosa), leche agria con *bifidus*, leche cuajada, manteca de crema agria.

La carne se divide por ejemplo en carne de vaca o de pollo fresca o carne picada.

40 Los productos cárnicos preferentemente se preparan para salchichas, alimentos para animales de compañía, carne curada con nitrito y nitrato (carne cruda picada), carne con sal cocinada, salchichas crudas, etc.

45 Los productos como por ejemplo ensaladas preparadas con carne, pescado, moluscos, crustáceos, vegetales, pasta y mezclas de los mismos, pero también con pescado, productos de pesca, moluscos, crustáceos, frutas, productos de frutas, frutos secos, productos de frutos secos y vegetales tales como patatas, productos vegetales, maíz y productos del maíz pueden estar protegidos por la mezcla.

Las combinaciones posibles de alimentos mencionadas anteriormente que comprenden la mezcla según la invención también se sienten o están comprendidas en la presente invención.

50 Los productos alimenticios preferentemente son productos derivados de frutos secos, maíz, grasas.

Los medicamentos que pueden ser protegidos por la mezcla son remedios naturales y orgánicos.

55 Según una forma de realización de la invención, el alimento, el producto alimenticio o los medicamentos se tratan con un polvo que comprende la mezcla cuyo polvo opcionalmente comprende sustancias transportadoras adecuadas. Las sustancias transportadoras adecuadas son por ejemplo sacáridos, preferentemente monosacáridos, disacáridos o sus derivados.

60 Según otra forma de realización preferida de la invención, el alimento, el producto alimenticio o los medicamentos se tratan con un medio líquido que comprende la mezcla. Dicho medio líquido debe concebirse de modo que garantice la supervivencia de la mezcla. Puede ser por ejemplo un medio acuoso tal como un producto lácteo líquido o una solución fisiológica de cloruro sódico.

65 Según una forma de realización preferida de la invención, la mezcla se incorpora en el alimento, en el producto alimenticio o en el medicamento mediante mezcla, pulverización, etc., con lo que mediante pulverización u otro tipo adecuado de aplicación tal como inmersión, la mezcla se aplica sobre la superficie del alimento, producto alimenticio o medicamento.

En el caso de los productos lácteos, la mezcla preferentemente está compuesta por un líquido, con lo que el líquido se añade al artículo que va a ser protegido. La mezcla puede añadirse también como un concentrado muy congelado o liofilizado.

La mezcla según la invención que está incorporada preferentemente en la superficie del alimento, producto alimenticio o medicamentos y/o aplicada en la misma, más preferentemente dentro de los especificados anteriormente y/o sobre los mismos, permite en particular la inhibición de bacterias tales como *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Serratia liquefaciens*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* y mezclas de estas bacterias, eucariotas inferiores tales como algas y mezclas de eucariotas inferiores, hongos tales como *Candida magnoliae*, *Candida parapsilosis*, *Candida silvicola*, *Candida valida*, *Candida pulcherrima*, *Candida reukaufii*, *Candida krusei*, *Candida sp.*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Penicillium sp.*, mezclas de estos hongos así como mezclas de las bacterias y hongos mencionados anteriormente así como mezclas de las bacterias y hongos y eucariotas inferiores mencionados anteriormente.

La invención no se considera que está limitada a las bacterias, hongos, alimentos, productos alimenticios y medicamentos mencionados de forma explícita en la presente solicitud.

Breve descripción de los dibujos

La invención se pondrá más claramente de manifiesto y los objetivos distintos a los expuestos anteriormente resultarán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente de los mismos. Dicha descripción hace referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 presenta una composición de 82 cepas en agar-agar MARS que se origina en leche entera, queso, yogur, aceitunas negras, salami así como maíz y forraje graso que presenta actividades antimicóticas en un ensayo puntual con agar-agar y que está identificado con API 50 CHL. ^a identificado como *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* analizando el gen 16S ARNr.

La figura 2 presenta un gel de agarosa al 2% de la ampliación de un producto de 290 bp obtenido utilizando oligonucleótidos específicos del grupo *casei* junto con el cebador Y2 (Tabla 2). (A) *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM20; (B) *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM29; (C) *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM63; (D) *Lactobacillus casei* DSM 20011^T; (E) *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* DSM 5622^T y (F) *Lactobacillus rhamnosus* DSM 20021^T; 1, 4, 7, 10, 13, 16, *casei*/Y2, 2, 5, 8, 11, 14, 17, *para*/Y2; 3, 6, 9, 12, 15, 18, *rham*/Y2; 19, referencia negativa; kb, escala kb de ADN lineal; pUC, pUC19-ADN/marcador *MspI*(*HpaII*).

Figura 3: Concentraciones de levaduras (*Candida pulcherrima* 1-50/13) en 5 lotes diferentes de un modelo de alimento con diferentes cultivos protectores, almacenado a 6°C. (♦) $4,9 \times 10^8$ cfu/g de *Propionibacterium jensenii* SM11 y $1,2 \times 10^8$ cfu/g de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* SM20; (▲) $3,2 \times 10^8$ cfu/g *Propionibacterium jensenii* SM11 y $1,1 \times 10^8$ cfu/g *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* SM29; (■) $4,1 \times 10^8$ cfu/g *Propionibacterium jensenii* SM11 y $9,1 \times 10^7$ cfu/g *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM63; (□) $2,7 \times 10^8$ cfu/g *Propionibacterium jensenii* SM11 y $2,1 \times 10^8$ cfu/g *Lactobacillus plantarum* SM17; (◇) $2,7 \times 10^8$ cfu/g *Propionibacterium jensenii* SM11 y $9,3 \times 10^7$ cfu/g *Lactobacillus plantarum* SM39; (●) sin cultivo protector. El número de levaduras son valores medios de los duplicados.

Figura 4: Concentraciones de levaduras (*Candida pulcherrima* 1-50/13, *Candida magnoliae* 1-35/1, *Candida parapsilosis* 4-5/1 y *Zygosaccharomyces bailii* 1-48/1) en 7 lotes diferentes de un modelo de yogur con diferentes cultivos protectores almacenados a 6°C. (◇) $1,5 \times 10^7$ cfu/g de *Propionibacterium jensenii* SM11 y $4,3 \times 10^7$ cfu/g de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* SM20; (♦) $5,5 \times 10^7$ cfu/g de *Propionibacterium jensenii* SM11 y $1,7 \times 10^8$ cfu/g de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* SM20; (□) $2,0 \times 10^7$ cfu/g *Propionibacterium jensenii* SM11 y $3,8 \times 10^7$ cfu/g *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* SM29; (■) $2,8 \times 10^8$ cfu/g *Propionibacterium jensenii* SM11 y $1,7 \times 10^8$ cfu/g *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM29; (Δ) $1,6 \times 10^7$ cfu/g *Propionibacterium jensenii* SM11 y $1,7 \times 10^7$ cfu/g *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* SM63; (▲) $8,1 \times 10^7$ cfu/g *Propionibacterium jensenii* SM11 y $1,6 \times 10^8$ cfu/g *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* SM63; (●) sin cultivo protector. El número de levaduras son valores medios de los duplicados.

Modos de poner en práctica la invención

Ejemplos

Material y procedimientos

Cepas bacterianas y medios

Las cepas bacterianas y los hongos utilizados en este estudio se presentan en la Tabla 1.

TABLA 1

Cepas microbianas utilizadas en este estudio

	Cepa	Características relevantes	Condiciones del cultivo		Referencia	
			Temp.(°C)	Medio		
10	Propionibacterias y lactobacilos					
	<i>Propionibacterium jensenii</i> SM11	Actividad antimicrobiana	32	NLB	LME ^a	
	<i>Lactobacillus casei</i> DSM 20011 ^T	Tipo de cepa	30	MRS	DSM ^b	
	<i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i>					
	SM20	Actividad antimicrobiana	32	MRS	Este estudio	
15	SM29	Actividad antimicrobiana	32	MRS	Este estudio	
	SM63	Actividad antimicrobiana	32	MRS	Este estudio	
	DSM 5622 ^T	Tipo de cepa	30	MRS	DSM	
	<i>Lactobacillus plantarum</i>					
	SM17	Actividad antimicrobiana	32	MRS	Este estudio	
20	SM39	Actividad antimicrobiana	32	MRS	Este estudio	
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>					
	DSM 20021 ^T	Tipo de cepa	37	MRS	DSM	
	Otras cepas					
	<i>Bacillus cereus</i>					
25	DSM 31 ^T	Tipo de cepa	30	BHI	DSM	
	<i>Bacillus subtilis</i> 168		30	BHI	LME	
	<i>Enterococcus faecalis</i> DISPUESTO5		37	BHI	LME	
	<i>Staphylococcus aureus</i> VF4		37	BHI	LME	
	<i>Listeria innocua</i> L17		37	BHI	LME	
	<i>Listeria monocytogenes</i> M1		37	BHI	LME	
	<i>Citrobacter freundii</i> SEGUNDO84		30	BHI	LME	
	<i>Enterobacter cloacae</i> SEGUNDO95		30	BHI	LME	
	<i>Escherichia coli</i> B		37	BHI	LME	
	SEGUNDO63		37	BHI	LME	
30	<i>Klebsiella pneumoniae</i> SEGUNDO89		30	BHI	LME	
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028		37	BHI	ATCC ^c	
	<i>Serratia liquefaciens</i> SEGUNDO64		30	BHI	LME	
	<i>Candida</i> sp. 1-50/15		25	YM	Miescher (1999)	
	<i>Candida krusei</i> 3-69/2		25	YM	Miescher (1999)	
	<i>Candida magnoliae</i> 1-35/1		25	YM	Miescher (1999)	
	<i>Candida parapsilosis</i> 4-5/1		25	YM	Miescher (1999)	
	<i>Candida pulcherrima</i> 1-50/13		25	YM	Miescher (1999)	
	<i>Candida reukaufii</i> 4-73/4		25	YM	Miescher (1999)	
	<i>Candida silvicola</i> 4-42/1		25	YM	Miescher (1999)	
35	<i>Candida valida</i> 1-48/8		25	YM	Miescher (1999)	
	<i>Sporobolomyces salmoni</i> color 3-46/2		25	YM	Miescher (1999)	
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> 1-48/1		25	YM	Miescher (1999)	
	<i>Penicillium</i> sp.					
	2-21/7		25	YM	Miescher (1999)	
	2-21/12		25	YM	Miescher (1999)	
	2-52/2		25	YM	Miescher (1999)	
	3-58/3		25	YM	Miescher (1999)	
	40	^a Laboratory for Food Microbiology, Zurich, Suiza.				
		^b German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Alemania				
^c American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA.						
^T Tipo de cepa						

Se cultivaron cepas de *Propionibacterium* en caldo de cultivo NLB que consistía en caldo de cultivo de soja con 1% de tripticasa sin dextrosa (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, EUA), extracto de levadura al 1% y jarabe de lactato sódico al 1% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) descrito por Grinstead y Barefoot (1992). Los lactobacilos se propagaron en caldo de cultivo MRS con Tween 80 al 0,1% (Biolife, Italia). Todas las demás cepas se desarrollaron en caldo de cultivo BHI (Biolife, Italia) en condiciones de cultivo dadas en la Tabla 1. Los cultivos bacterianos se mantuvieron como soluciones madre congeladas a -80°C en caldo de cultivo que contiene glicerol al 30%. Las levaduras y los mohos se cultivaron en medio YM (Difco, Detroit, MI, EUA) y se mantuvieron a 4°C en medio sólido de agar-agar.

Los iniciadores comerciales para la fermentación del yogur se adquirieron en Danisco Cultor Niebüll GmbH, Alemania, que consistían en diferentes cepas de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.

ES 2 318 050 T3

Se produjeron cultivos protectores cultivando las cepas por separado en permeato de suero enriquecido (SWP1) que estaba constituido por permeato de suero al 5,5% (Emmi, Suiza), extracto de levadura al 1% (Becton Dickinson, MD, EUA) e hidrolizado de caseína al 2% (Merck, Alemania) durante 72 h. a 32°C. Se recogieron las células por centrifugación, se lavaron una vez o dos veces en NaCl al 0,85% y se volvieron a poner en suspensión en leche desnatada liofilizada (Difco, Detroit, MI, EUA) o en NaCl al 0,85% a una concentración necesaria que oscila entre 10 y 100 veces. La leche desnatada liofilizada se trató térmicamente con anterioridad tres veces a 90°C durante 30 min. los tres días siguientes.

Un aumento a escala y un procedimiento de optimización se realizó cultivando las células independientemente en un biorreactor 8-1 o 19-1 (tipo L1523; Bioengineering, Suiza) a 32°C, con una agitación de 250 rpm utilizando 2% de inóculo. La fermentación se realizó en permeato de suero enriquecido (SWP2) que estaba constituido por permeato de suero al 5,5%, extracto de levadura al 1% y glucosa al 2%. El pH se controló a 6,0 añadiendo NaOH 3 M. Simultáneamente al control de pH, se consiguió un alimento de nutrientes con extracto de levadura al 20% y glucosa al 20%. El inóculo se cultivó en permeato de suero enriquecido (SWP1) a 32°C durante 72 h. sin agitación. Se retiraron las muestras de las fermentaciones periódicamente y se analizaron las concentraciones celulares y la densidad óptica a 650 nm. Se cultivaron lactobacillus durante 72 h, propionibacterias durante 90 h. Se recogieron las células, se lavaron y se concentraron como se describió anteriormente.

Aislamiento de bacterias del ácido láctico

Se digirieron 10 g de muestra de alimento durante 2 minutos con 90 ml de tampón de dilución (NaCl al 0,85%, peptona al 0,1%), se diluyeron en serie y se colocaron en placas en agar-agar MRS con Tween 80 al 0,1%. Las muestras de leche se diluyeron directamente y se colocaron en placas. Las placas se incubaron en condiciones anaeróbicas a 37°C durante 3 días. De cada muestra de alimento, se seleccionó una variedad de colonias diferentes para una identificación para actividades antimicrobianas.

Procedimientos de identificación de actividades antimicrobianas

Se utilizaron dos procedimientos:

(1) *Ensayo con puntos en agar-agar*: El cultivo productor se inoculó con puntos en una placa de agar-agar según Grinstead y Barefoot (1992) y se incubó en condiciones de crecimiento óptimo (Tabla 1). Cada placa se cubrió con 6 ml de agar-agar blando templado (0,6%) que contenía 0,2 ml de un cultivo indicador que se había cultivado hasta una densidad de 0,2. Se midió la densidad óptica de las bacterias a 650 nm, la de las levaduras y mohos a 580 nm. El medio de agar-agar, el medio de agar-agar blando y la incubación de las placas se seleccionaron apropiados para la prueba y los organismos indicadores. La inhibición del césped indicador se controló después de 24 a 48 h. para las bacterias, la inhibición de los hongos se puntuó diariamente, después de 3 días a 25°C.

(2) *Ensayo de difusión en pocillos*: Se cortaron pocillos de un diámetro de 7 mm para placas con agar-agar y se rellenaron con sobrenadantes exentos de células y de cultivos bacterianos como describe Daeschel (1992). Después de la difusión completa del líquido, el agar-agar blando que contenía un organismo indicador se vertió sobre las placas para demostrar la actividad inhibidora tal como se describió anteriormente. El medio de agar-agar, el medio de agar-agar blando y la incubación de las placas se seleccionaron de manera apropiada para la prueba y organismos indicadores.

Caracterización e identificación de cepas bacterianas

Se tiñeron con Gram cepas cultivadas en agar-agar con MRS que presentan actividades antimicrobianas y se examinó al microscopio su morfología celular. Además se determinó la actividad de la catalasa salpicando las colonias con peróxido de hidrógeno al 30% y se realizó una tinción de las esporas. Se realizó una identificación preliminar de la cepa utilizando API 50 CHL (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, Francia). Además, se determinó la proteólisis en agar-agar con MRS con leche desnatada al 5% y 10% y se analizó mediante enzimas la producción de ácidos orgánicos (Boehringer Mannheim, Alemania; kit utilizado para D/L-ácido láctico: E1 112 821/kit utilizado para ácido acético: E0 148 261). Además, se determinaron las condiciones del cultivo en el caldo de cultivo con MRS a diferentes temperaturas durante 72 h. y con salinidades del 5% y 10% a 32°C durante 72 h.

Identificación de cepas seleccionadas por secuenciado parcial con 16S ADN

Se realizó la ampliación de 16S ADN utilizando directamente una colonia de la cepa correspondiente. Se realizó la PCR con oligonucleótidos universales bak4 (Goldenberger, 1997) y bakllw (Greisen *et al.*, 1994 modificado por Dasen *et al.* 1998) utilizando 40 ciclos. Se consiguió la hibridación a 56°C durante 30 s. y se produjo la extensión con Taq ADN polimerasa (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) a 72°C durante 2 min., la separación de la cadena de ADN se realizó a 95°C durante 5 s. Se purificó el ADN ampliado utilizando GFX™ PCR ADN y el kit de purificación de bandas en gel (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Se realizó el secuenciado del ciclo automático con la Terminator Ready Reaction Mix (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y los oligonucleótidos que se dirigen a 16S ADN (Tabla 2).

TABLA 2

Oligonucleótidos que se dirigen al 16S ADNr

Denominación	Secuencia	Comentarios	Referencia
Y2	5'-TGGCTCAGAACGAACGCTAGGCCCG-3'	16S ADNr ^a conservado	Young et al.(1991)
casei	5'-TGCACTGAGATTGCACTTAA-3'	<i>Lactobacillus casei</i> 16S rDNA	Ward and Timmins (1999)
para	5'-CACCOAGATTCAACATGG-3'	16S ADNr de <i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>Paracasei</i>	Ward and Timmins (1999)
rham	5'-TGCATCTTGATTTAATTTTG-3'	16S ADNr de <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Ward and Timmins (1999)
bak4	5'-AGGAGGTGATCCARCCGCA-3'	16S ADNr conservado	Greisen et al.(1994)
bakllw	5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	16S ADNr conservado	Goldenberger (1997)
eub338	5'-ACTCCTACGGGAGGCAGC-3'	16S ADNr conservado	Amann et al. (1995)
uni515	5'-ACCGCGGCTGCTGGCAC-3'	16S ADNr conservado	Lane (1991)
uni785	5'-GGMTTAGATACCCTGGTAGTCC-3'	16S ADNr conservado	Amann et al.(1995)
uni1088	5'-CGTTAAGTCCCGCAACGAGC-3'	16S ADNr conservado	Amann et al.(1995)
uni1392	5'-GTACACACCGCCCGTCA-3'	16S ADNr conservado	Lane (1991)

^a correspondiente a una zona conservada de la mayoría de las secuencias bacterianas de 16S ADNr conocidas

Se llevaron a cabo 35 ciclos de la forma siguiente: 96°C durante 10 s., 50°C durante 30 s. y 60°C durante 4 min. El secuenciado de nucleótidos de ambas cadenas del ADN clonado se realizó por el procedimiento de terminación de la cadena de didesoxi (Sanger *et al.*, 1977) con un cebador errante utilizando el BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit y el aparato analizador genético ABI PRISM ABI 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para análisis. El análisis de la secuencia del ADN, las alineaciones de la secuencia y la investigación de la base de datos de la secuencia se realizaron con los programas contenidos en el Sequence Analysis Software Package (versión 10.0) con licencia del Genetics Computer Group (University of Wisconsin, Madison, WI, EUA).

Se compararon las secuencias mediante el algoritmo de Pearson y Lipman (1988) (FastA y TFASTA) con las secuencias en la copia de la base de datos GenEMBL.

Diferenciación de Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei y Lactobacillus rhamnosus por reacción en cadena de polimerasa

Se llevó a cabo la ampliación de 16S ADNr tal como describen Ward y Timmins (1999) con algunas modificaciones. Se amplió un fragmento de 290 bp del 16S ADNr utilizando cebadores específicos para la especie (*casei*, *para*, *rham*) junto con el cebador Y2 correspondiente a la zona conservada del 16S ADNr (Tabla 2). Cada 50 µl de reacción contenían 2,5 U de Taq polimerasa, Tris-HCl 10 mM (pH 9,0), MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, dNTP Set 1 mM, 1 µM de cada cebador y una colonia de la cepa correspondiente. La Taq polimerasa, los tampones y dNTP Set se adquirieron en Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Microsynth (Balgach, Suiza). El programa de temperatura fue el descrito por Young *et al.* (1991): 300 s a 93°C, 35 ciclos de (45 s a 93°C, 45 s a 62°C y 120 s a 72°C) y 300 s a 72°C con un enfriamiento final a 4°C. Se separaron los productos de la ampliación en un gel de agarosa al 2%.

Investigación de las actividades antimicrobianas en placas con agar-agar

Se prepararon placas con agar-agar, enriquecidas con *Propionibacterium jensenii* SM11 o un *Lactobacillus* antimicrobiano o una combinación de ambos. Los cultivos se cultivaron previamente por separado durante 72 h a 32°C en permeato de suero enriquecido (SWP1), se centrifugaron, se lavaron una vez y se volvieron a poner en suspensión (1:1) en NaCl al 0,85% y a continuación se diluyeron en serie en tampón de dilución (NaCl al 0,85%, peptona al 0,1%). Se prepararon porciones de 20 ml de agar-agar con 10% de cada dilución para proporcionar una concentración final de 10⁵, 10⁶, 10⁷ y 10⁸ cfu/ml. Las placas con agar-agar se vertieron y después de la solidificación, se inocularon en puntos porciones de aproximadamente 2 a 5 µl de los caldos de cultivo de las cepas indicadoras en las placas. Se utilizó agar-agar YM para las levaduras y mohos y agar-agar BHI para las bacterias. Placas de agar-agar en tripletes se almacenaron a 6°C, 12°C y 25°C durante hasta 4 semanas y el crecimiento de los organismos indicadores se controló semanalmente para 6°C o diariamente para 12°C y 25°C. Como referencia, se prepararon placas de agar-agar sin

ES 2 318 050 T3

enriquecimiento de lactobacilos y propionibacterias así como las placas con agar-agar con una adición de 1 g/l de Ka-Sorbat (EU-Richtlinie, nº 95/2/EG).

Investigación de actividades antimicóticas en un modelo de alimento

Se montó un modelo de alimento con porciones de 50 g de leche desnatada liofilizada (Difco, Detroit, MI, EUA) que fermentaron con un cultivo de yogur comercial. Se inocularon además las muestras de ensayo con un cultivo de protección (1% de un cultivo concentrado 100 veces de *Propionibacterium jensenii* SM11 y 1% de un cultivo concentrado de 1% de un cultivo concentrado 100 veces de un *Lactobacillus* antimicótico para proporcionar una concentración de 10^8 células/g de cada uno. Se lavaron previamente dos veces los cultivos y se volvieron a poner en suspensión en leche desnatada liofilizada. Para obtener resultados comparables, la muestra de referencia se mezcló con leche desnatada liofilizada al 2%. Se realizó la fermentación durante 5 horas aproximadamente a 42°C hasta que se alcanzó el pH de 4,6. Se contaminaron todas las muestras con *Candida pulcherrima* 1-50/13 a una concentración final de 10^2 cfu/g. Además se preparó una muestra de referencia sin contaminación de levaduras. Se almacenaron las muestras a 6°C durante 7 semanas y se enumeraron semanalmente las propionibacterias y lactobacilos protectores así como las levaduras. Simultáneamente, se controló el pH semanalmente.

Inhibición de hongos en yogur mediante cultivos de protección

Se trataron térmicamente a 90°C durante 10 min. porciones de 200 g de leche enriquecida con 5% de crema (35% de grasa, 2,5% de proteínas), 2% de leche desnatada en polvo y 5% de azúcar y a continuación se fermentó con un cultivo de yogur comercial. Se inocularon además muestras de ensayo con un cultivo de protección (0,1% o 1% de un cultivo concentrado 100 veces de *Propionibacterium jensenii* SM11 y 0,1% o 1% de un cultivo concentrado 100 veces de una cepa de *Lactobacillus* antimicótica) para proporcionar una concentración de 10^7 o 10^8 cfu/g de cada uno. Se lavaron previamente dos veces los cultivos de protección y se volvieron a poner en suspensión en leche desnatada liofilizada. La fermentación se realizó durante aproximadamente 5 horas a 42°C hasta que el pH alcanzó 4,6. El yogur se contaminó con una mezcla de *Candida pulcherrima* 1-50/13, *Candida magnoliae* 1-35/1, *Candida parapsilosis* 4-5/1 y *Zygosaccharomyces bailii* 1-48/1 a una concentración final de 10^2 cfu/g. Además se preparó una muestra de referencia sin contaminación de levaduras. Se almacenó el yogur a 6°C durante 4 semanas y se enumeraron las levaduras semanalmente. Simultáneamente, se controló el pH semanalmente. El día 1 y después de 3 semanas de almacenamiento, se enumeraron las propionibacterias y los lactobacilos de protección y además después de 3 semanas se determinó enzimáticamente el lactato y el acetato (Boehringer Mannheim, Alemania; kit utilizado para ácido láctico D/L: E1 112 821/kit utilizado para ácido acético E0 148 261).

Escala en aumento de la aplicación de un cultivo de protección en yogur

Se realizaron asimismo pruebas a escala en aumento con yogur que comprende el cultivo de protección como se describió anteriormente.

Inhibición de levaduras en una superficie de queso mediante cultivos de protección

Se prepararon cubetas iguales ($2,5 \times 4,8 \times 8$ cm) de 100 g de queso duro (Gruyère). Para evitar una contaminación con microorganismos de la superficie del queso, se cortaron previamente 3 a 5 mm de la corteza del queso. Un lote de queso se empapó con cada uno de los lados de la cubeta en un cultivo de protección (5 ml de un cultivo concentrado 20 veces de *Propionibacterium jensenii* SM11 y 5 ml de un cultivo concentrado 20 veces de una cepa antimicótica de *Lactobacillus*) para proporcionar una concentración de 10^8 cfu/g de la superficie del queso de cada uno. Los cultivos de protección se lavaron previamente dos veces y se volvieron a poner en suspensión en NaCl al 0,85%. Otros dos lotes de queso se prepararon con cultivos protectores diluidos 10 veces y 100 veces. En la superficie de las cubetas de los tres lotes, se aplicaron de este modo aproximadamente 3 ml del cultivo de protección concentrado respectivo. A continuación se contaminaron los quesos con 1 ml (10^4 cfu/ml) de una mezcla de *Candida pulcherrima* 1-50/13, *Candida magnoliae* 1-35/1, *Candida parapsilosis* 4-5/1 y *Zygosaccharomyces bailii* 1-48/1 hasta alcanzar una concentración final de 10^2 cfu/g de la superficie del queso. La superficie de los quesos se definió como una capa de aproximadamente 3 mm desde el exterior del cubo. Se preparó una muestra de referencia sin adición de levaduras. Se sellaron los quesos en bolsas de plástico estériles y se almacenaron durante 3 semanas a 6°C. El día 1 y después de 3 semanas de almacenamiento, se determinó la concentración de propionibacterias y lactobacilos de protección así como el número de levaduras.

Inhibición de Listeria mediante un cultivo de protección en un modelo de alimento

Se montaron dos modelos de alimento para actividades antibacterianas de ensayo de un cultivo de protección contra *Listeria*.

(1) Inhibición de Listeria innocua L17 y Listeria monocytogenes M1 mediante un cultivo de protección en crema

Se inocularon 200 g de leche semidesnatada pasteurizada (25% de grasa, 2,5% de proteína) con *Listeria innocua* L17 o *Listeria monocytogenes* M1, respectivamente, a una concentración final de 10^3 cfu/g y a continuación se dividieron en dos porciones de 100 g en frascos esterilizados. Se inoculó una muestra con cultivo de protección (5% de un cultivo concentrado 20 veces de *Propionibacterium jensenii* SM11 y 5% de un cultivo concentrado 20 veces

de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM20) hasta proporcionar una concentración de 10^8 cfu/g de cada uno. Se lavaron previamente dos veces los cultivos de protección y se volvieron a poner en suspensión en leche desnatada liofilizada. Para obtener concentraciones comparables, se añadió 10% de leche desnatada liofilizada a la muestra de referencia. Todas las muestras se guardaron a 6°C durante 4 semanas. El pH y el crecimiento de *Listeria* se controlaron semanalmente, después de 1 día y después de 4 semanas, se comprobó la concentración del cultivo de protección también. Se preparó un segundo lote tal como se describe y se almacenó a 25°C durante 3 semanas. Asimismo, se determinaron los números de cultivos protectores y de *Listeria* al comienzo y al final del almacenaje.

(2) Inhibición de *Listeria innocua* L17 mediante cultivos de protección en carne picada

Se mezclaron porciones de 100 g de carne picada con un cultivo de protección (5% de un cultivo concentrado 20 veces de *Propionibacterium jensenii* SM11 y 5% de un cultivo concentrado 20 veces de una cepa antimicrobiana de *Lactobacillus*) hasta proporcionar una concentración de 10^8 cfu/g de cada uno. Los cultivos protectores se lavaron dos veces previamente y se volvieron a poner en suspensión en NaCl al 0,85%. La carne se contaminó con *Listeria innocua* L17 a una concentración final de 10^3 cfu/g y a continuación se guardó a 6°C durante 8 semanas. Además se preparó una muestra de referencia sin cultivo de protección. Para obtener concentraciones comparables, se añadieron a esta muestra 10% de NaCl al 0,85%. Las propionibacterias y lactobacilos de protección así como *Listeria innocua* L17 se numeraron semanalmente, se controló el pH al final del periodo de almacenaje.

Resultados

Actividades antimicóticas en *Lactobacillus* sp.

Se realizó una identificación preliminar de las actividades antimicrobianas con 1424 cepas en agar-agar MRS procedente de leche entera, queso, yogur, aceitunas negras, pasta agria, salami, así como maíz y forraje graso. Un total de 82 cepas presentaban actividades en un ensayo con puntos en agar-agar frente a los hongos listados en la Tabla 1. Estas cepas se caracterizaron más por tinción Gram, actividad de catalasa, examen microscópico y formación de esporas. Como se representa en la Figura 1 las especies que pertenecen al grupo de *Lactobacillus casei* presentaban principalmente actividades antimicóticas con una compartición del 24%. Una identificación preliminar con API 50 CHL clasificó estas cepas como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus*. Además las especies de *Lactobacillus plantarum* presentaban elevadas actividades inhibitoras para con los hongos ensayados. Un total del 6% de las cepas antimicóticas parecía ser de cocos y el 18% permaneció sin identificar utilizando patrones de fermentación.

Identificación y caracterización de tres lactobacilos muy antimicóticos

Se continuó identificando tres cepas con grandes actividades antimicóticas utilizando análisis secuencial del ADN de 16S. Estudiando los metabolismos de los carbohidratos, se identificaron previamente como *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* (SM20 y SM29) y *Lactobacillus curvatus* (SM63). El análisis secuencial del 16S ADN de estas cepas puso de manifiesto la especie *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* para la cepa SM20 con una identidad del 100% en 1519 nucleótidos solapantes con la secuencia parcial del 16S ADN de *Lactobacillus paracasei* JCM8130 (D79212) y con la secuencia parcial de 16S ADN de un *Lactobacillus casei* (D86517). Se identificaron un total de 1520 nucleótidos del 16S ADN de la cepa SM20. Los 1528 nucleótidos secuenciados procedentes de la cepa SM29 presentaron una identidad del 99,9% en 1520 nucleótidos solapantes con la secuencia parcial del gen 16S de ARNr de un *Lactobacillus casei* (D86517) y con la secuencia parcial de 16S de ADN de *Lactobacillus paracasei* JCM8130 (D79212). Sorprendentemente, los 1515 nucleótidos identificados del gen 16S de ARNr de la cepa SM63 presentaban también una identidad del 99,9% en 1493 nucleótidos solapantes con el gen 16S de ARNr de un *Lactobacillus casei* (D86517) y con la secuencia parcial del 16S de ADN de *Lactobacillus paracasei* JCM8130 (D79212).

Ya que los miembros del grupo *casei* forman un grupo muy homólogo en relación con los criterios fenotípicos así como con los datos de la secuencia del gen 16S de ARNr, Ward y Timmins (1999) desarrollaron un método sencillo de PCR para diferenciar las especies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus* basándose en la reclasificación de Collins *et al.* (1989). La Figura 2 presenta un producto específico de 290 bp para las cepas SM20, SM29 y SM63 ampliadas en una reacción en cadena de la polimerasa con el cebador específico para *Lactobacillus paracasei* utilizado junto con el cebador Y2, que se dirigen ambos al gen 16S de ARNr. Las cepas típicas de *Lactobacillus casei* (DSM 20011^T) y *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* (DSM 5622^T) pusieron de manifiesto también una banda de 290 bp con los correspondientes cebadores. Sorprendentemente, *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 20021^T) no presentaban la banda específica después de la reacción en cadena de la polimerasa con Y2 y *rham*. Además, no se observaban productos si este primer par (Y2/*rham*) se utilizaba con las cepas que han de identificarse. De este modo, se identificaron las cepas SM20, SM29 y SM63 como *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei*. La Tabla 3 presenta un resumen de la identificación de las tres cepas así como de su caracterización.

Tabla 3: Identificación y caracterización de las cepas SM20, SM29, SM63 y SM11.

Cepa	Origen	Microscopía	Esporas	Ácido producido	Productos de fermentación ^a	Condiciones de cultivo	Tolerancia al NaCl	Actividad proteolítica	Actividad de catalasa	Identificación	
										Secuenciado ^c	PCR ^d
SM20	Leche entera	Barras cortas en cadenas. Gram positivas ^a	Negativo	Ribosa, Galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, Manitol, Sorbitol, N-acetil-glucosamina, Amigdalina, Arbutina, Esculina, Salicina, Celobiosa, Maltosa, Lactosa, Sacarosa, Trehalosa, Inulina, Melezitosa, β -gentiobiosa, D-turanosa, D-tagatosa	D-, L-lactato	15-45°C (Opt: 32-37°C)	10% ^e	negativa	negativa	<i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i> y <i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i>
SM29	Salami	barras cortas en cadenas. Gram positivas ^a	negativo	Ribosa, Adonitol, Galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, Ramnosa, Dulcitol, Manitol, Sorbitol, A-metil-D-manósido, A-metil-D-glucósido, N-acetil-glucosamina, Amigdalina, Arbutina, Esculina, Salicina, Celobiosa, Maltosa, Lactosa, Sacarosa, Trehalosa, Inulina, Melezitosa, β -gentiobiosa, D-turanosa, D-tagatosa	D-, L-lactato	15-45°C (Opt: 32-37°C)	5% ^f	negativa	negativa	<i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i> y <i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i>
SM63	Leche entera	barras cortas en cadenas. Gram positivas	negativo	Ribosa, Galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, Manitol, Sorbitol, N-acetil-glucosamina, Maltosa, Lactosa, Trehalosa, Melezitosa, D-tagatosa	D-, L-lactato	15-45°C (Opt: 32-37°C)	5% ^g	negativa	negativa	<i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i> y <i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i>
SM11	Leche entera	Pleomórfico con forma de barra, Gram-positivo		Eritritol, D-arabinosa, Ribosa, Adonitol, Galactosa, D-glucosa, D-Fructosa, D-Mannosa, Lactosa, D-Arabitol	Acetato, Propionato ^f	15-37°C (Opt: 30-32°C)	5% ^k	negativa	positiva	<i>Propionibacterium jensenii</i>	

Tabla 3 (continuación)

^a determinada utilizando AP1 50 CHL
^b determinados enzimáticamente (Boehringer Mannheim, Alemania; kit utilizado para el D/L-ácido láctico: E1 112 821/kit utilizado para ácido acético: E0 148 261)
^c análisis secuencial del 16S de ADN ^r
^d método PCR modificado según Ward y Timmins (1999)
^e barras largas en cadenas en cultivos en biorreactor
^f Miescher (1999)
^g buen crecimiento a una salinidad del 5% y crecimiento bastante bueno al 10%
^h buen crecimiento a una salinidad de NaCl al 5% y crecimiento muy débil al 10%
ⁱ buen crecimiento a una salinidad del 5% y crecimiento débil al 10%
^k crecimiento bastante bueno a una salinidad de 5% de NaCl y crecimiento muy débil al 10%
^l las especies subrayadas indican la identificación final de la cepa correspondiente

Collins *et al.* (1989) describieron otra subespecie de *Lactobacillus paracasei*, a saber *Lactobacillus paracasei* subesp. *tolerans*. Con respecto a la producción de ácido observada por Collins *et al.* (1989), las cepas SM20, SM29 y SM63 pertenecen a la subespecie *paracasei*.

5 *Secreción de sustancias inhibidoras en el medio del caldo de cultivo*

Se examinó la capacidad para segregar sustancias inhibidoras en el medio del caldo de cultivo de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM20, *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM29, *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM63, *Lactobacillus plantarum* SM17 y *Lactobacillus plantarum* SM39. Por consiguiente las cepas se cultivaron en caldo de cultivo MRS o en medio SWP1. No se detectó ninguna actividad antagonística en los sobrenadantes exentos de células utilizando una prueba de difusión buena. Incluso una etapa de concentración por ultrafiltración (corte a un peso molecular de 3.000 Da) no puso de manifiesto ninguna actividad detectable (datos no representados).

15 *Actividades antimicóticas en placas de agar-agar*

Se determinaron las actividades antimicóticas de un total de 18 lactobacilos solos o en combinación con la SM11 de *Propionibacterium jensenii* muy antimicótica. Por consiguiente, se incorporaron las cepas, tras la centrifugación y una etapa de lavado en concentraciones de 10^5 a 10^8 cfu/ml en placas con YM agar-agar en las que los hongos listados en la Tabla 1 se sembraron con puntos en las concentraciones correspondientes desde 10^1 a 10^7 cfu/ml. Las placas se guardaron en diferentes lotes a 6°C, 12°C y 25°C. Se controló semanalmente o a diario el crecimiento de las levaduras, respectivamente. Aunque, los lactobacilos así como la cepa de *Propionibacterium* presentaban solamente actividades inhibidoras débiles utilizándolas solas (datos no mostrados) su combinación puso de manifiesto valores antagonísticos elevados a 6°C. Las mayores actividades se detectaron con los siguientes lactobacilos en combinación con *Propionibacterium jensenii* SM11: de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM20, *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM29, *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM63. Se observaron actividades débiles con *Lactobacillus plantarum* SM17 y *Lactobacillus plantarum* SM39 junto con la cepa SM11. Un número de células de 10^8 cfu/ml de la cepa de *Lactobacillus* y 10^8 cfu-ml de la cepa *Propionibacterium* fue necesario para actividades inhibidoras altas. La Tabla 4 indica cinco ejemplos de actividades antimicóticas observadas a 6°C con una concentración de 10^8 cfu/ml (10^7 cfu/ml para *Lactobacillus plantarum* SM17) contra cepas inoculadas con puntos en una densidad de 10^6 cfu/ml y contra cultivos de mohos de 3 días inoculados con puntos.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 4: Actividades antimicóticas de cultivos de protección seleccionados incorporados en placas de agar-agar tras un almacenamiento de 21 días a 6°C o de 7 días a 12°C

Organismos indicadores ^a	Cultivos protectores ^b						
	SM20/SM11 (pH 3.83) c	SM29/SM11 (pH 3.98)	SM63/SM11 (pH 3.93)	SM17/SM11 (pH 4.53)	SM39/SM11 (pH 4.59)	referencia (pH 5.88)	Ka-Sorbat (1g/l) d
Almacenaje a 6°C/21 d							
<i>Candida magnoliae</i> 1-35/1	+	+/-	+	++	++	++	++
<i>Candida parapsilosis</i> 4-5/1	-	-	-	-	-	(+/-)	-
<i>Zygosacharomyces bailii</i> 1-48/1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida silvicola</i> 4-42/1	(+/-)	(+/-)	(+/-)	++	++	++	++
<i>Candida valida</i> 1-48/8	(+/-)	(+/-)	(+/-)	++	++	+	-
<i>Candida pulcherrima</i> 1-50/13	(+/-)	-	(+/-)	++	++	++	++
<i>Candida reukaufii</i> 4-73/4	-	-	-	++	++	++	++
<i>Candidasp.</i> 1-50/15	(+/-)	(+/-)	(+/-)	++	++	++	++
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> 3-46/2	-	-	-	-	-	++	-
<i>Candida krusei</i> 3-69/2	-	-	-	(+/-)	(+/-)	(+/-)	-
<i>Penicillium</i> sp. 2-21/7	-	-	-	n.d.	n.d.	++	n.d.
<i>Penicillium</i> sp. 2-21/12	-	-	-	n.d.	n.d.	++	n.d.
<i>Penicillium</i> sp. 2-52/2	-	-	-	n.d.	n.d.	++	n.d.
<i>Penicillium</i> sp. 3-58/3	-	-	-	n.d.	n.d.	++	n.d.
Almacenaje 12°C / 7 d							
<i>Candida magnoliae</i> 1-35/1	(+/-)	+	+	+	+	++	n.d.
<i>Candida parapsilosis</i> 4-5/1	-	(+/-)	-	+/-	+/-	++	n.d.
<i>Zygosacharomyces bailii</i> 1-48/1	-	(+/-)	(+/-)	(+/-)	-	+/-	n.d.
<i>Candida silvicola</i> 4-42/1	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	++	n.d.
<i>Candida valida</i> 1-48/8	-	+	+	++	+	++	n.d.
<i>Candida pulcherrima</i> 1-50/13	-	++	+	++	++	++	n.d.
<i>Candida reukaufii</i> 4-73/4	-	+	-	++	++	++	n.d.
<i>Candidasp.</i> 1-50/15	-	++	++	++	++	++	n.d.
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> 3-46/2	-	-	-	+	+/-	+/-	n.d.
<i>Candida krusei</i> 3-69/2	+	++	++	++	++	++	n.d.

Tabla 4 (continuación)

SM20:	Lactobacillus paracasei subsp. paracasei	SM20	(10 ⁸ cfu/ml)
SM29:	Lactobacillus paracasei subsp. paracasei	SM29	(10 ⁸ cfu/ml)
SM63:	Lactobacillus paracasei subsp. paracasei	SM63	(10 ⁸ cfu/ml)
SM17:	Lactobacillus plantarum	SM17	(10 ⁷ cfu/ml)
SM39:	Lactobacillus plantarum	SM39	(10 ⁷ cfu/ml)
SM11:	Propionibacterium jensenii	SM11	(10 ⁸ cfu/ml)
n.d.:	no determinado ++ colonia fuerte (≈ 0% de inhibición)		
^a	inoculación por puntos con 10 ⁶ cfu/ml + colonia normal (= 25% de inhibición)		
^b	incorporada en placas de agar-agar +/- colonia débil (= 50% de inhibición)		
^c	pH medido en placas de agar-agar tras un almacenamiento de 21 días a 6°C (+/-) colonia muy débil = 75% de inhibición		
^d	concentración según EU-Richtlinie, n° 95/2/EG - sin colonias (= 100% de inhibición)		

ES 2 318 050 T3

Resulta interesante que utilizando Ka-Sorbat, se observó una actividad inhibidora más débil a 6°C que con los cultivos antimicrobianos de este estudio (cepas SM20, SM29 o SM63 en combinación con la cepa SM11). La Tabla 4 representa además, que tras un almacenaje de 7 días a 12°C se observó una clara actividad inhibidora para las cepas SM20, SM29 y SM63 de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* y una actividad débil para las cepas SM17 y SM39 de *Lactobacillus plantarum* junto con la cepa SM11 de *Propionibacterium jensenii*. A 25°C sólo se observaron actividades inhibidoras débiles que desaparecieron después de unos pocos días (datos no mostrados). Experimentando las actividades antimicóticas de dos o tres lactobacilos (cepas SM20, SM29 y SM63 de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei*) junto con la cepa SM11 de *Propionibacterium jensenii*, se observó un aumento de la inhibición (Tabla 5) en comparación con las pruebas en las que se utilizó 1 cepa de *Lactobacillus* en combinación con SM11 (Tabla 4). Se alcanzó una inhibición total de las levaduras utilizando las cepas SM20, SM29 o SM63 de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* junto con la SM11 de *Propionibacterium jensenii* y 1 g/l de Ka-Sorbat (Tabla 5). La actividad antimicótica de las cepas bacterianas aumentó con el conservante del alimento.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 5: Actividades antimicóticas de cultivos de protección seleccionados incorporados en placas con agar-agar tras un almacenaje de 21 días a 6°C

Organismos indicadores ^a	Cultivos de protección ^b							Referencia (pH 6,04)
	SM20/SM2 9/SM11 (pH 4,27) ^c	SM20/SM63/ SM11 (pH 4,32)	SM29/SM63/ SM11 (pH 4,33)	SM20/SM29/S M63/ SM11 (pH 4,10)	SM20/SM11/ Ka-Sorbat ^d 4,67)	SM29/SM11/ Ka-Sorbat (pH 4,80)	SM63/SM11/ Ka-Sorbat (pH 4,75)	
<i>Candida magnoliae</i> 1-35/1	(+/-)	(+/-)	+/-	(+/-)	-	-	-	++
<i>Candida parapsilosis</i> 4-5/1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Zygosacharomyces bailii</i> 1-48/1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida silvicola</i> 4-42/1	-	-	-	-	-	-	-	++
<i>Candida valida</i> 1-48/8	-	-	(+/-)	-	-	-	-	(+/-)
<i>Candida pulcherrima</i> 1-50/13	-	-	(+/-)	-	-	-	-	++
<i>Candida reukaufii</i> 4-73/4	-	-	-	-	-	-	-	++
<i>Candida</i> sp. 1-50/15	-	-	(+/-)	-	-	-	-	+
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> 3-46/2	-	-	-	-	-	-	-	+/-
<i>Candida krusei</i> 3-69/2	-	-	-	-	-	-	-	-

SM20: *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* SM20 (10⁸ cfu/ml)
 SM29: *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* SM29 (10⁸ cfu/ml)
 SM63: *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* SM63 (10⁸ cfu/ml)
 SM11: *Propionibacterium jensenii* SM11 (10⁸ cfu/ml)

n.d.: no determinado

^a inoculación por puntos con 10⁶ cfu/ml

^b incorporada en placas de agar-agar

^c pH medido en placas de agar-agar tras un almacenaje de 21 días a 6°C

^d 1 g/l concentración según EU-Richtlinie, n° 95/2/EG

++ colonia fuerte (≈ 0% de inhibición)

+ colonia normal (≈ 25% de inhibición)

+/- colonia débil (≈ 50% de inhibición)

(+/-) colonia muy débil = 75% de inhibición

- sin colonias (≈ 100% de inhibición)

Actividades antibacterianas de cultivos de protección en placas con agar-agar

Se continuó determinando la capacidad de las cepas SM20, SM29 y SM63 de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* para inhibir las bacterias gram-positivas y gram-negativas solas o en combinación con la SM11 de *Propionibacterium jensenii*. Por consiguiente, se incorporaron las cepas tras la centrifugación y una etapa de lavado en una concentración de 10^8 cfu/ml en placas con BHI agar-agar en las que los cultivos de toda la noche de las bacterias correspondientes se sembraron con puntos. Se almacenó a 6°C un lote de las placas y se controló el crecimiento de las bacterias semanalmente, se incubó una segunda a 25°C y se puntuó diariamente su inhibición. De nuevo, los lactobacilos así como la cepa *Propionibacterium* presentaban actividades inhibitorias débiles utilizándolas solas (datos no mostrados) pero su concentración puso de manifiesto valores antagonísticos altos (Tabla 6).

TABLA 6

Actividades antibacterianas de cultivos de protección seleccionados incorporados en placas con agar-agar tras un almacenaje de 21 días a 6°C o a 25°C

Organismos indicadores ^a	Cultivos de protección ^b			
	SM20/SM11 (pH 5.45 ^c)	SM29/SM11 (pH 5.48)	SM63/SM11 (pH 5.40)	control (pH 6.70)
Almacenaje a 6°C / 21 d				
<i>Listeria innocua</i> L17	-	-	-	++
<i>Staphylococcus aureus</i> VF4	-	-	-	(+/-)
<i>Escherichia coli</i> B	-	-	-	(+/-)
<i>Escherichia coli</i> SG63	-	-	-	+/-
<i>Serferatia liquefaciens</i> SG64	-	(+/-)	+	++
<i>Citrobacter freundii</i> SG84	(+/-)	(+/-)	(+/-)	++
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SG89	(+/-)	(+/-)	+/-	++
<i>Enterobacter cloacae</i> SG95	(+/-)	(+/-)	(+/-)	+
<i>Enterococcus faecalis</i> DS5	-	-	-	+
<i>Bacillus subtilis</i> 168	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> DSM 31 ^T	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14058	-	-	-	++
<i>Listeria monocytogenes</i> M1	-	-	-	++
Almacenaje a 25°C/21d				
<i>Listeria innocua</i> L17	-	-	-	++
<i>Staphylococcus aureus</i> VF4	+	+/-	+/-	++
<i>Escherichia coli</i> B	+	(+/-)	(+/-)	++
<i>Escherichia coli</i> SG63	+/-	-	-	++
<i>Serferatia liquefaciens</i> SG64	+/-	+	+/-	++
<i>Citrobacter freundii</i> SG84	(+/-)	+/-	(+/-)	++
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SG89	(+/-)	+/-	+	++
<i>Enterobacter cloacae</i> SG95	(+/-)	+	+	++
<i>Enterococcus faecalis</i> DS5	(+/-)	(+/-)	(+/-)	++
<i>Bacillus subtilis</i> 168	-	-	-	++
<i>Bacillus cereus</i> DSM 31 ^T	-	(+/-)	(+/-)	++
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	-	-	-	++
<i>Listeria monocytogenes</i> M1	-	-	-	++
SM20: <i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i> SM20 (10^8 cfu/ml)				
SM29: <i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i> SM29 (10^8 cfu/ml)				
SM63: <i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i> SM63 (10^8 cfu/ml)				
SM11: <i>Propionibacterium jensenii</i> SM11 (10^8 cfu/ml)				
^a inoculación por puntos con 10^6 cfu/ml				
^b incorporada en placas de agar-agar				
^c pH medido en placas de agar-agar tras un almacenaje de 21 días a 6°C				
++ colonia fuerte (= 0% de inhibición) (+/-) colonia muy débil = 75% de inhibición				
+ colonia normal (= 25% de inhibición) - sin colonias (= 100% de inhibición)				
+/- colonia débil (= 50% de inhibición)				

Actividades antimicóticas de cultivos de protección almacenados

Con el fin de determinar la capacidad para almacenar los cultivos de protección, éstos se mantuvieron por separado a una concentración de 100 veces (resuspendidos en leche desnatada liofilizada) a -80°C durante 15 semanas. A continuación, se incorporaron las cepas a una concentración de 10^8 cfu/ml en placas con YM agar-agar en las que las levaduras listadas en la Tabla 1 se sembraron en puntos a concentraciones entre 10^4 y 10^7 cfu/ml. Se almacenaron las placas a 6°C y se controló semanalmente el crecimiento de las levaduras. Como referencia, se preparó una placa con agar-agar con adición de una cantidad apropiada de leche desnatada. La Tabla 7 presenta un resumen, que los cultivos protectores están constituidos por SM11 de *Propionibacterium jensenii* y una cepa de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* (SM20, SM29 o SM63) todavía presentaba actividades antimicóticas inalteradas después de un almacenaje de 15 semanas a -80°C.

TABLA 7

Actividades antibacterianas de cultivos de protección seleccionados tras un almacenaje de 15 semanas a -80°C, incorporados en placas con agar-agar

Organismos indicadores ^a	Cultivos de protección ^b			
	SM20/SM11	SM29/SM11	SM63/SM11	referencia
<i>Candida magnoliae</i> 1-35/1	+/-	+/-	+/-	++
<i>Candida parapsilosis</i> 4-5/1	-	-	-	(+/-)
<i>Zygosacharomyces bailii</i> 1-48/1	-	-	-	-
<i>Candida silvicola</i> 4-42/1	-	-	-	++
<i>Candida valida</i> 1-48/8	+	+	+	+
<i>Candida pulcherrima</i> 1-50/13	+/-	+/-	+	++
<i>Candida reukaufii</i> 4-73/4	-	-	-	++
<i>Candida</i> sp. 1-50/15	+	+	+	++
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> 3-46/2	-	-	-	+/-
<i>Candida krusei</i> 3-69/2	-	-	-	-
SM20: <i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i> SM20 (10^8 cfu/ml)				
SM29: <i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i> SM29 (10^8 cfu/ml)				
SM63: <i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i> SM63 (10^8 cfu/ml)				
SM11: <i>Propionibacterium jensenii</i> SM11 (10^8 cfu/ml)				
n.d.: no determinado				
^a inoculación por puntos con 10^6 cfu/ml				
^b incorporada en placas de agar-agar				
^c pH medido en placas de agar-agar tras un almacenaje de 21 días a 6°C				
++ colonia fuerte (= 0% de inhibición)				
+ colonia normal (= 25% de inhibición)				
+/- colonia débil (= 50% de inhibición)				
(+/-) colonia muy débil = 75% de inhibición				
- sin colonias (= 100% de inhibición)				

Actividades antimicóticas de cultivos de protección en un modelo de alimento

Para una prueba preliminar, se montó un modelo de alimento con diferentes cultivos de protección. Se añadieron cepas antagonísticas a leche desnatada liofilizada a concentraciones iniciales de 10^8 cfu/g. Éstas eran *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM20, *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM29, *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM63, *Lactobacillus plantarum* SM17 y *Lactobacillus plantarum* SM39 en combinación con *Propionibacterium jensenii* SM11. Además se inocularon las muestras con *Candida pulcherrima* 1-50/13 a concentraciones de 10^2 cfu/g y a continuación se almacenaron a 6°C. Tal como se indica en la Figura 3, las concentraciones de levaduras aumentaron constantemente hasta 10^7 - 10^8 cfu/g en las muestras con las cepas SM17 y SM39 de *Lactobacillus plantarum* así como en la muestra de referencia que presenta los valores mayores. Las muestras que contienen *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* (SM20, SM29 o SM63) presentaban diferencias significativas. En estas muestras, *Candida pulcherrima* 1-50/13 aumentó hasta un nivel de 10^4 cfu/g y a continuación permaneció casi estable durante siete semanas. Después de cuatro semanas las muestras con SM63 de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* presentaba un aumento en las levaduras. La concentración de propionibacterias y lactobacilos ni aumentó ni disminuyó durante el almacenaje. El pH de las muestras con cultivos protectores no presentó ninguna diferencia significativa con respecto a la muestra de referencia (datos no mostrados).

Actividades antimicóticas en yogur

Se montó una prueba más con yogur y cultivos de protección consistentes en las cepas SM20, SM29 o SM63 de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* en combinación con la SM11 de *Propionibacterium jensenii*. Por consiguiente, se utilizó una leche enriquecida con nutrientes que debería favorecer el crecimiento de levaduras contaminantes. Esta leche se fermentó con un cultivo de yogur comercial en presencia de un cultivo de protección. Los cultivos de protección se utilizaron a concentraciones de 10^7 cfu/g o de 10^8 cfu/g, respectivamente. Después de la fermentación y enfriamiento, se inocularon las muestras con una mezcla de *Candida pulcherrima* 1-50/13, *Candida magnoliae* 1-35/1, *Candida parapsilosis* 4-5/1 y *Zygosaccharomyces Bailly* 1-48/1 a una concentración de 10^2 cfu/g y a continuación se almacenaron a 6°C. La Figura 4 demuestra que las concentraciones de levaduras en las muestras con cultivos de protección a una concentración de 10^7 cfu/g, así como en la muestra de referencia, aumentaba constantemente. No obstante, la muestra de referencia siempre presentaba los mayores valores de levaduras contaminantes. En todas las muestras que contienen los cultivos protectores a una concentración de 10^8 cfu/g no se observó ningún aumento de levaduras. La concentración de levaduras permaneció estable durante un periodo de 4 semanas. El mismo fenómeno se observó con concentraciones de $1,7 \times 10^8$ cfu/g de lactobacilos y de $5,5 \times 10^7$ cfu/g de propionibacterias (Tabla 11). En todas las muestras, las concentraciones de cultivo de protección ni aumentaron ni disminuyeron durante el almacenamiento. El pH de las muestras con cultivos de protección no presentó ninguna diferencia significativa con la muestra de referencia (datos no mostrados). Como se muestra en la Tabla 8, en las muestras con cultivos de protección se determinaron con enzimas 60 a 70 mg/100 g de acetato, mientras que solamente se detectaron 4,43 mg/100 g en la muestra de referencia sin cultivo de protección.

TABLA 8

Concentraciones determinadas con enzimas de ácidos orgánicos metabolizados en yogur con cultivos de protección

Cultivos de protección	Ácidos orgánicos			
	Acetato (mg/100 g)	D-lactato (g/100 g)	L-lactato (g/100 g)	Lactato total (g/100 g)
SM20/SM11 ^a	68,84	0,01	0,61	0,62
SM29/SM11 ^b	60,95	0,01	0,62	0,63
SM63/SM11 ^c	61,44	0,01	0,65	0,66
Control ^d	4,43	0,01	0,74	0,75
SM20 : <i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i> SM20				
SM29: <i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i> SM29				
SM63: <i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i> SM63				
SM11: <i>Propionibacterium jensenii</i> SM11				
^a SM20, $1,7 \times 10^8$ cfu/g; SM11, $5,5 \times 10^7$ cfu/g				
^b SM29, $1,7 \times 10^8$ cfu/g; SM11, $2,8 \times 10^8$ cfu/g				
^c SM63, $1,6 \times 10^8$ cfu/g; SM11, $8,1 \times 10^7$ cfu/g				
^d sin cultivo de protección				

En cambio, el cultivo de protección no influyó en el contenido de D-lactato, L-lactato así como en el lactato total (Tabla 8).

Utilizando diferentes pruebas organolépticas, los yogures con cultivos de protección y las muestras de referencia sin cultivo adicional no presentaban diferencias perceptibles tras periodos de almacenamiento de 5 y 15 días.

Aplicación a escala de un cultivo de protección para yogur

Las pruebas a escala en aumento con yogur proporcionaron resultados similares a los obtenidos mediante las pruebas a escala de laboratorio.

Actividades antimicóticas en la superficie del queso

La Tabla 9 presenta la inhibición de una mezcla de levaduras en las superficies de quesos, tratados con tres cultivos de protección diferentes a distintas concentraciones. Todos los quesos se contaminaron con levaduras hasta alcanzar una concentración final en la superficie de 10^2 cfu/g. La superficie de los quesos estaba definida como una capa de aproximadamente 3 mm desde el exterior de la cuba.

TABLA 9

Inhibición de levaduras en las superficies del queso mantenidas a 6°C

Tiempo (días)		cfu/g de levaduras ^a		
		A	B	C
K1	1	5,0x10 ²	3,2x10 ²	4,1x10 ²
	21	1,5x10 ²	<10 ²	<10 ²
	1	5,5x10 ²	1,0x10 ²	4,1x10 ²
	21	3,5x10 ²	<10 ²	<10 ²
K3	1	2,2x10 ³	2,7x10 ²	1,3x10 ³
	21	1,3x10 ⁴	<10 ²	1,0x10 ²
K4	1	6,3x10 ²		
	21	8,0x10 ³		

A: inoculados con levaduras y cultivo de protección SM20/SM11

B: inoculados con levaduras y cultivo de protección SM29/SM11

C: inoculados con levaduras y cultivo de protección SM63/SM11

K1: concentración de cultivo de protección: 10⁷-10⁸ cfu/g de superficieK2: concentración de cultivo de protección: 10⁶-10⁷ cfu/g de superficieK3: concentración de cultivo de protección: aprox. 10⁶ cfu/g de superficie

K4: referencia, inoculada con levaduras, sin añadir cultivo de protección

^amezcla de *Candida pulcherrima* 1-50/13, *Candida magnoliae* 1-35/1, *Candida parapsilosis* 4-5/1 y *Zygosaccharomyces Bailly* 1-48/1

A las concentraciones de 10⁸ y 10⁷ cfu/g de superficie, los cultivos de protección podían inhibir la excrecencia de levaduras totalmente durante un almacenamiento de 21 días a 6°C. El número de levaduras disminuyó uniformemente (K1, K2). Una concentración de 3,0 × 10⁶ cfu/g de la superficie de lactobacilos y 3,0 × 10⁶ cfu/g de la superficie de las propionibacterias parecía ser el límite para alcanzar una inhibición mínima de las levaduras. La muestra K3A de queso presentaba concentraciones inferiores de cultivo de protección y de este modo no inhibió la excrecencia de las levaduras contaminantes. Las concentraciones de cultivos de protección en la superficie de los quesos estaban en el mismo intervalo que los números de células de las soluciones en las que los quesos se habían impregnado previamente (datos no mostrados).

Inhibición de Listeria en modelos de alimento con cultivos de protección

La Tabla 10 resume la inhibición de *Listeria* con cultivos de protección en carne picada y crema.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 318 050 T3

TABLA 10

Inhibición de *Listeria* por cultivos protectores en modelos de alimento mantenidos a 6°C y 25°C

Sistemas de alimento	Tiempo (días)	cfu/g de <i>Listeria innocua</i> L17			
		A	B	C	D
Carne molida (6°C)	1	$3,3 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$
	28	$6,0 \times 10^2$	$3,7 \times 10^2$	$2,7 \times 10^2$	$4,5 \times 10^2$
	42	$1,7 \times 10^3$	$< 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$< 10^2$
	56	$5,1 \times 10^3$	$8,2 \times 10^2$	$< 10^2$	$1,5 \times 10^2$
Carne molida (25°C)	0	$4,1 \times 10^3$	$4,9 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	$3,7 \times 10^3$
	2	$4,5 \times 10^4$	$5,5 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	$7,5 \times 10^3$
	5	$6,8 \times 10^4$	$5,9 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$	$5,5 \times 10^3$
Crema (6°C)	1	$2,7 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$	n,d	n,d
	14	$1,3 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	n,d	n,d
	21	$1,1 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$	n,d	n,d
	28	$1,0 \times 10^3$	$< 10^2$	n,d	n,d
Crema (25°C)	1	$2,9 \times 10^2$	$2,6 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$
	21	$107-10^8$	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$
		cfu/g de <i>Listeria monocytogenes</i> M1			
		A	B	C	D
Crema (6°C)	1	$1,6 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$	n,d	n,d
	7	$2,9 \times 10^7$	$1,9 \times 10^3$	n,d	n,d
	14	$3,0 \times 10^8$	$7,5 \times 10^2$	n,d	n,d

A: referencia, inoculada con cultivo añadido de *Listeria* sin protección
 B: inoculada con *Listeria* y cultivo de protección SM20/SM11
 C: inoculada con *Listeria* y cultivo de protección SM29/SM11
 D: inoculada con *Listeria* y cultivo de protección SM63/SM11
 n.d.: sin determinar

Se seleccionaron los dos modelos de alimento para representar alimento con humedad elevada con diferentes contenidos de grasa y proteína y un pH óptimo para *Listeria*. Aunque *Listeria innocua* L17 presentó buen desarrollo después de 21 días en agar-agar con BHI almacenado a 6°C (Tabla 6), no se detectó en los modelos de alimento. Las cantidades viables del organismo indicador, sin embargo, disminuyeron en presencia de un cultivo de protección. Además, estas muestras presentaban todavía un bonito color rojo de sangre después de un almacenamiento de 56 días y la muestra de referencia era verde a parda y claramente deteriorada. El pH de la muestra de referencia fue de 6,20 después de 56 días, la de una de las muestras con cultivos de protección estaba comprendida en un intervalo entre 5,50 y 5,81. La concentración de propionibacterias y lactobacilos permaneció inalterada durante el almacenamiento a 6°C durante un periodo de 56 días. Una segunda carga de carne picada con y sin cultivos protectores se almacenó a 25°C. Después de un almacenamiento de 5 días, L17 de *Listeria innocua* se mantuvo en comprobación en las muestras con cultivos de protección ($3,2$ a $5,9 \times 10^3$ cfu/g) mientras que la cantidad viable del organismo indicador aumentó hasta $6,8 \times 10^4$ cfu/g en la muestra de referencia. Además, la muestra de referencia había evolucionado completamente mal. La crema almacenada a 6°C presentaba el mismo fenómeno después de 28 días. En la muestra de referencia, la cantidad de *Listeria innocua* L17 estaba todavía en el mismo intervalo que al comienzo (10^3 cfu/g) pero en la muestra con cultivo de protección, la cantidad viable de organismo indicador disminuyó hasta inferior a 10^2 cfu/g. La concentración de lactobacilos y propionibacterias ni aumentó ni disminuyó durante el almacenamiento. Los valores de pH en las muestras con o sin cultivo de protección estaban comprendidos en el mismo intervalo. Después de un almacenamiento de 28 días a 6°C el fenómeno de la crema ha disminuido hasta 4,78 en la muestra sin cultivo de protección y hasta 4,60 en la muestra con cultivo de protección. En las muestras de crema almacenadas a 25°C en L17 de *Listeria innocua* disminuyó por debajo de 10^2 cfu/g en presencia de cultivos protectores pero aumentó hasta un número de células entre 10^7 y 10^8 cfu/g en la muestra de referencia. Asimismo el pH de estas muestras cambió claramente. Las muestras con cultivos de protección estaban comprendidas en un intervalo entre 3,56 y 3,68, mientras que la muestra de referencia todavía presentaba un pH de 5,80. Tras 21 días de almacenamiento a 25°C, el número de células de lactobacilos y propionibacterias estaba todavía en el mismo intervalo que al comienzo. Las concentraciones de cultivos de protección ni aumentaron ni disminuyeron. En las muestras con M1 de *Listeria monocytogenes* como organismo indicador se observó una clara diferencia en la cantidad viable del patógeno en presencia o ausencia del cultivo protector. Después de un almacenamiento de 14 días a 6°C, la muestra sin cultivo protector contenía $3,0 \times 10^8$ cfu/g de M1 de *Listeria monocytogenes* mientras que en la muestra con el cultivo protector el número del organismo protector había disminuido hasta $7,5 \times 10^2$ cfu/g (Tabla 10).

Concentración necesaria de cultivo de protección en alimento para una actividad antimicrobiana suficiente

Para alcanzar una actividad antimicrobiana suficiente, era necesario una determinada concentración de lactobacilos y propionibacterias. Las Tablas 11 y 12 presentan las diferentes pruebas de este estudio y las concentraciones correspondientes de cultivo de protección.

TABLA 11

Concentraciones de cultivos de protección utilizadas en las diferentes pruebas para detectar actividades antimicrobianas (cfu/g)

Cultivos	Pruebas							
	Placas de agar-agar ^a		Modelo de alimento		Yogur ^b		Yogur ^c	
	LB	PAB	LB	PAB	LB	PAB	LB	PAB
SM20/SM11	10 ⁸	10 ⁸	1.2 x 10 ⁸	4.9 x 10 ⁸	1.7 x 10 ⁸	5.5 x 10 ⁷	4.3 x 10 ⁷	1.5 x 10 ⁷
SM29/SM11	10 ⁸	10 ⁸	1.1 x 10 ⁸	3.2 x 10 ⁸	1.7 x 10 ⁸	2.8 x 10 ⁸	3.8 x 10 ⁷	2.0 x 10 ⁷
SM63/SM11	10 ⁸	10 ⁸	9.1 x 10 ⁷	4.1 x 10 ⁸	1.6 x 10 ⁸	8.1 x 10 ⁷	1.7 x 10 ⁷	1.6 x 10 ⁷

SM20: *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM20

SM29: *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM29

SM63: *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM63

SM11: *Propionibacterium jensenii* SM11

LB: lactobacilos

PAB: propionibacterias

n.d.: no determinada

^a la concentración del cultivo de protección se determinó solo experimentalmente

^b (1% de cada cepa en una concentración de 100 veces)

^c (0,1% de cada cepa en una concentración de 100 veces)

TABLA 12

Concentraciones de cultivos de protección utilizadas en las diferentes pruebas para detectar actividades antibacterianas (cfu/g)

Cultivos	Pruebas									
	Placas de agar-agar ^a		Carne picada ^b		Carne picada ^c		Crema ^d		Crema ^e	
	LB	PAB	LB	PAB	LB	PAB	LB	PAB	LB	PAB
SM20/SM11	10 ⁸	10 ⁸	1.1 x 10 ⁹	6,3x10 ⁹	4,8x10 ⁸	2,9x10 ⁸	9,3x10 ⁸	3,8x10 ⁹	1,0x10 ⁹	5,7x10 ⁹
SM29/SM11	10 ⁸	10 ⁸	1,2x10 ⁹	8,1x10 ⁹	4,9x10 ⁸	4,0x10 ⁸	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SM63/SM11	10 ⁸	10 ⁸	1,6x10 ⁸	8,7x10 ⁹	1,2x10 ⁸	3,0x10 ⁸	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

SM20: *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM20

SM29: *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM29

SM63: *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM63

SM11: *Propionibacterium jensenii* SM11

LB: lactobacilos

PAB: propionibacterias

n.d.: no determinada

^a la concentración del cultivo se determinó solo experimentalmente

^b carne picada almacenada a 6°C con *Listeria innocua* L17

^c carne picada almacenada a 25°C con *Listeria innocua* L17

^d crema almacenada a 6°C con *Listeria innocua* L17

^e crema almacenada a 6°C con *Listeria monocytogenes* M1

Para alcanzar de este modo una actividad antimicrobiana óptima del cultivo de protección era necesario una concentración de por lo menos 1,7 x 10⁸ cfu/g o cfu/ml de lactobacilos junto con 5,5 x 10⁷ cfu/g o cfu/ml de propionibacterias (Tabla 11). En la superficie del queso, una concentración de 1,0 x 10⁷ cfu/g de superficie de lactobacilos y 5,0 x 10⁶ cfu/g de superficie de propionibacterias parecía ser la concentración mínima que debe alcanzar una actividad antimicrobiana constante satisfactoria (datos no mostrados). Para una actividad antibacteriana suficiente, la concentración inferior determinada fue de 1,2 x 10⁸ cfu/g o cfu/ml de lactobacilos junto con 3,0 x 10⁸ cfu/g o cfu/ml de propionibacterias que presentan todavía buenas propiedades inhibidoras (Tabla 12). Según las investigaciones conocidas las actividades antimicrobianas están comprendidas en el mismo intervalo que las antimicrobianas.

Aunque en la presente memoria se han mostrado y descrito las formas de realización preferidas de la invención, debe apreciarse que la invención no se limita a las mismas, pudiendo materializarse de manera variada y ponerse en práctica dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

5 Referencias

- Al-Zoreky**, M. H., **J. W. Ayres** y **W. E. Sandine**. 1991. Antimicrobial activity of Microgard™ against food spoilage and pathogenic microorganisms. *J. Dairy Sci.* 74: 758-763.
- 10 **Amann**, R. I., **W. Ludwig**, **K.-H. Schleifer**. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- Collins**, M. D., **B. A. Philips** y **P. Zannoni**. 1989. Deoxyribonucleic acid homolgy studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. paracasei and subsp. tolerans and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 105-108.
- 15 **Daeschel**, M. A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 43: 164-167.
- 20 **Daeschel**, M. A. 1992. Procedures to detect antimicrobial activities of microorganisms. En Food biopreservatives of microbiological origin. (R. Bibek y M. A. Daeschel eds.). *CRC Press*, Inc. Boca Raton, Ann Arbor, London y Tokyo. 57-80.
- Dasen**, G., **J. Smutny**, **M. Teuber** y **L. Meile**. 1998. Classification and identification of Propionibacteria based on ribosomal RNA genes and PCR. *System. Appl. Microbiol.* 21: 251-259.
- 25 EU-Richtlinie Nr. 95/2/EG des Europäischen Parlaments und des Rats vom 20. Februar 1995 über andere Lebensmittelzusatzstoffe, Farbstoffe und Süßungsmittel.
- 30 Federal Register. 1988. Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. 21 CFR Part 184, volume 53: 11247-11251.
- Goldenberger**, D. 1997. Detection of bacterial pathogens in clinical specimen by broad range PCR amplification and direct sequencing of part of the 16S rRNA gene. *PhD thesis* No. 12219, ETH, Zurich, Switzerland.
- 35 **Greisen**, K., **M. Loeffelholz**, **A. Purohit** y **D. Leon**. 1994. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 32: 335-351.
- Grinstead**, D. A. y **S. F. Barefoot**. 1992. Jensenin G, a heat-stable bacteriocin produced by *Propionibacterium jensenii* P126. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 215-220.
- 40 **Holzappel**, W. H., **R. Geisen** y **U. Schillinger**. 1995. Review Paper. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade-enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 343-362.
- 45 **Jung**, G. 1991. Lantibiotics: a survey. En Nisin and novel lantibiotics (Jung, G. y H.-G. Sahl, eds.). *Escom Publishers*, Leiden, The Netherlands. 1-34.
- Lane**, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. En: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. (Stackebrandt, E. y M. Goodfellow eds.). *John Wiley & Sons*, New York, USA. 115-176.
- 50 **Miescher**, S. 1999. Antimicrobial and autolytic systems of dairy propionibacteria. *PhD thesis* No. 13486. ETH, Zurich, Switzerland.
- Pearson**, P. W. R., y **D. J. Lipman**. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444-2448.
- 55 **Sanger**, F., **S. Nicklen**, y **A. R. Coulson**. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- 60 **Soumalainen**, T. H. y **A. M. Märyä-Mäkinen**. 1999. Propionic acid bacteria as protective cultures in fermented milks and breads. *Lait* 79: 165-174.
- Vogel**, R. F. 1996. Biotechnology of starter organisms for non-dairy lactic food fermentations (Mini-Review). *Adv. Food Sci.* 18: 46-51.
- 65 **Ward**, L. J. H. y **M. J. Timmins**. 1999. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 90-92.

ES 2 318 050 T3

Young, J. P. W., H. L. Downer y B. D. Eardly. 1991. Phylogeny of the phototrophic rhizobium strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* 173: 2271-2277.

Zusatzstoffverordnung über die in Lebensmitteln zulässigen Zusatzstoffe, vom 26. Juni 1995, Stand am 22. Februar 2000. Eidgenössisches Departement des Innern: Dreifuss. EDMZ, Bern.

Cepas depositadas

Las cepas siguientes se han depositado el 20.09.2001 en el DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ).

- La cepa *Propionibacterium jensenii* SM11 ha sido depositada con el número DSM 14513
- La cepa *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* SM20 ha sido depositada con el número DSM 14514.
- La cepa *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* SM29 ha sido depositada con el número DSM 14515.
- La cepa *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* SM63 ha sido depositada con el número DSM 14516.

REIVINDICACIONES

1. Mezcla de bacterias, **caracterizada** porque dicha mezcla de bacterias es un cultivo no iniciador que está exento de metabolitos y comprende por lo menos una primera bacteria seleccionada de entre la especie *Propionibacterium jensenii* y por lo menos una segunda bacteria seleccionada de entre el género *Lactobacillus*.

2. Mezcla de bacterias que es un cultivo no iniciador según la reivindicación 1, que puede obtenerse por el procedimiento que comprende las etapas que consisten en:

- Incorporación de una mezcla de bacterias que comprende por lo menos una primera bacteria seleccionada de entre la especie *Propionibacterium jensenii* y por lo menos una segunda bacteria seleccionada de entre el género *Lactobacillus* y que está exenta de metabolitos en un medio o sobre la superficie de un medio contenido en un primer recipiente de modo que resulta una concentración de por lo menos 1×10^8 cfu/ml o 1×10^8 cfu/g o 1×10^7 cfu/cm² de cada una de dichas primera y segunda bacterias;
- Incorporación de contaminantes en el medio y/o aplicación sobre la superficie del medio de dicho primer recipiente;
- Incorporación en el medio y/o aplicación sobre la superficie del medio contenido en un segundo recipiente de los mismos contaminantes que los incorporados en el medio y/o aplicados sobre la superficie del medio de dicho recipiente, siendo dicho medio idéntico al medio de dicho primer recipiente pero careciendo de dicha mezcla de bacterias;
- Determinación de la inhibición de dichos contaminantes por dicha mezcla de bacterias almacenando dichos primer y segundo recipientes a una temperatura adecuada durante un periodo de almacenamiento adecuado y comparando el número y/o la concentración de contaminantes en el medio y/o sobre la superficie del medio contenido en dichos primer y segundo recipientes, en la que dicha mezcla de inhibición es tal que el número y/o la concentración de dichos contaminantes en el medio y/o sobre la superficie del medio contenido en dicho segundo recipiente es mayor que el número y/o la concentración en el medio y/o sobre la superficie del medio contenido en dicho primer recipiente durante por lo menos parte de dicho periodo de almacenamiento; en la que dicha mezcla de bacterias se considera que se inhibe si el número de contaminantes en el medio y/o sobre la superficie del medio contenido en dicho segundo recipiente es por lo menos log 1, preferentemente por lo menos log 2, muy preferentemente por lo menos log 3, más preferentemente por lo menos log 4, aún más preferentemente por lo menos log 5, todavía más preferentemente por lo menos log 6 mayor que el número de contaminantes sobre la superficie del medio contenido en dicho primer recipiente durante por lo menos 3 días, preferentemente por lo menos 7 días, muy preferentemente por lo menos 14 días, más preferentemente por lo menos 21 días, y aún más preferentemente 25 días.

3. Mezcla de bacterias según la reivindicación 2, **caracterizada** porque dicho medio es alimento o producto alimenticio o preferentemente medio de agar-agar.

4. Mezcla de bacterias según la reivindicación 2 ó 3, **caracterizada** porque dicha temperatura adecuada es de aprox. 6 a 25°C, preferentemente dicha temperatura adecuada es por lo menos una seleccionada de entre el grupo de aprox. 6°C, aprox. 12°C, aprox. 25°C y dicho periodo de almacenamiento adecuado es de 7 a 28 días, preferentemente dicho periodo de almacenamiento adecuado es por lo menos uno seleccionado de entre el grupo de 7 días, 14 días, 21 días y 28 días.

5. Mezcla de bacterias según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, **caracterizada** porque dichos contaminantes son hongos o bacterias o mezclas de los mismos.

6. Mezcla de bacterias según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque la proporción entre dicha primera bacteria y dicha segunda bacteria asciende a entre 1:100 y 10:1, preferentemente 1:10 y 10:1.

7. Mezcla de bacterias según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque dicha segunda bacteria se selecciona de entre el grupo constituido por *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* y mezclas de las mismas.

8. Mezcla de bacterias según la reivindicación 7, **caracterizada** porque dicha segunda bacteria se selecciona de entre una o más cepas de *Lactobacillus paracasei*, subesp. *paracasei*.

9. Mezcla de bacterias según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque dicha segunda bacteria se selecciona de entre el grupo constituido por *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM20, *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM29, *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM63, y mezclas de las mismas.

10. Mezcla de bacterias según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque dicha primera bacteria es *Propionibacterium jensenii* SM11.

ES 2 318 050 T3

11. Alimento, producto alimentario o medicamento **caracterizado** porque dicho alimento, producto alimentario o medicamento comprende la mezcla de bacterias según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

12. Alimento según la reivindicación 11, **caracterizado** porque dicho alimento se selecciona de entre el grupo de productos lácteos, preferentemente productos lácteos agrios y/o productos cárnicos.

13. Procedimiento para la preparación del alimento, producto alimenticio o medicamento, en particular el alimento según la reivindicación 11 ó 12, que comprende las etapas que consisten en:

- Adición de la mezcla de bacterias según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 durante la preparación del alimento, producto alimenticio o medicamento de modo que la concentración de dicha por lo menos una primera bacteria y dicha por lo menos una segunda bacteria en el alimento, producto alimenticio o medicamento asciende cada una a por lo menos 1×10^8 cfu/ml o cada una a por lo menos 1×10^8 cfu/g del alimento, producto alimenticio o medicamento o cada una a por lo menos 1×10^7 cfu/cm² de la superficie del alimento, producto alimenticio o medicamento;
- Control de los parámetros de preparación durante la preparación de modo que dicha concentración de dicha mezcla de bacterias permanece constante.

14. Procedimiento según la reivindicación 13, **caracterizado** porque la concentración de dicha primera bacteria en el alimento, producto alimenticio o medicamento asciende a por lo menos 1×10^9 cfu/ml o por lo menos 1×10^9 cfu/g del alimento, producto alimenticio o medicamento o por lo menos 1×10^8 cfu/cm² de la superficie del alimento, producto alimenticio o medicamento y dicha segunda bacteria asciende a por lo menos 1×10^8 cfu/ml de dicho alimento, producto alimenticio o medicamento o por lo menos 1×10^8 cfu/g de dicho alimento, producto alimenticio o medicamento o por lo menos 1×10^7 cfu/cm² de la superficie de dicho alimento, producto alimenticio o medicamento o viceversa.

15. Procedimiento según la reivindicación 13 ó 14, que comprende una o más etapas de fermentación, **caracterizado** porque dicha mezcla de bacterias se añade antes de dichas una o más etapas de fermentación y/o entre dichas más etapas de fermentación y/o después de dichas una o más etapas de fermentación.

16. Procedimiento para almacenar el alimento, producto alimenticio o medicamento según la reivindicación 11 ó 12 o el alimento, producto alimenticio o medicamento preparado según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, que comprende la etapa que consiste en controlar los parámetros de almacenamiento durante el almacenamiento de modo que dicha concentración de dichas primera y segunda bacterias permanece constante.

17. Utilización de la mezcla de bacterias según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para inhibir microorganismos seleccionados de entre el grupo constituido por hongos, bacterias y mezclas de los mismos que son patógenos y/o descomponedores, en particular en alimento, producto alimenticios o medicamentos.

18. Bacterias seleccionadas de entre el grupo constituido por DSM 14513 (*Propionibacterium jensenii* SM11) DSM 14514 (*Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM20), DSM 14515 (*Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM29), DSM 14516 (*Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* SM63), o mezclas de los mismos.

Fig. 1

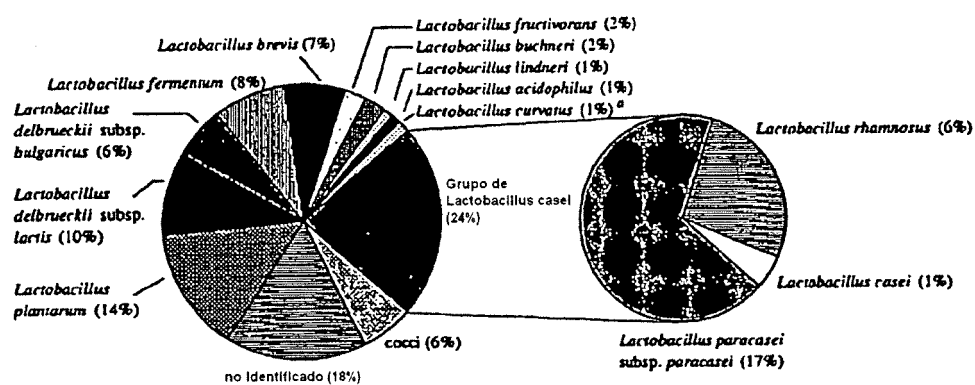


Fig. 2

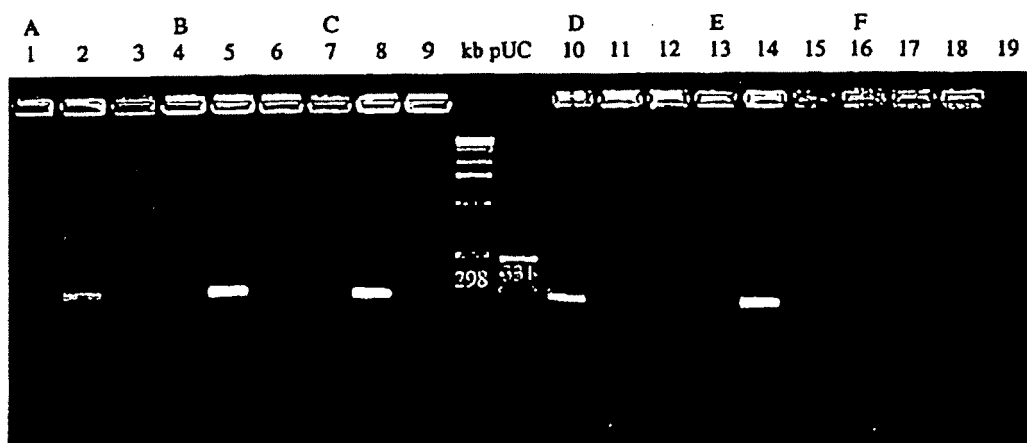


Fig. 3

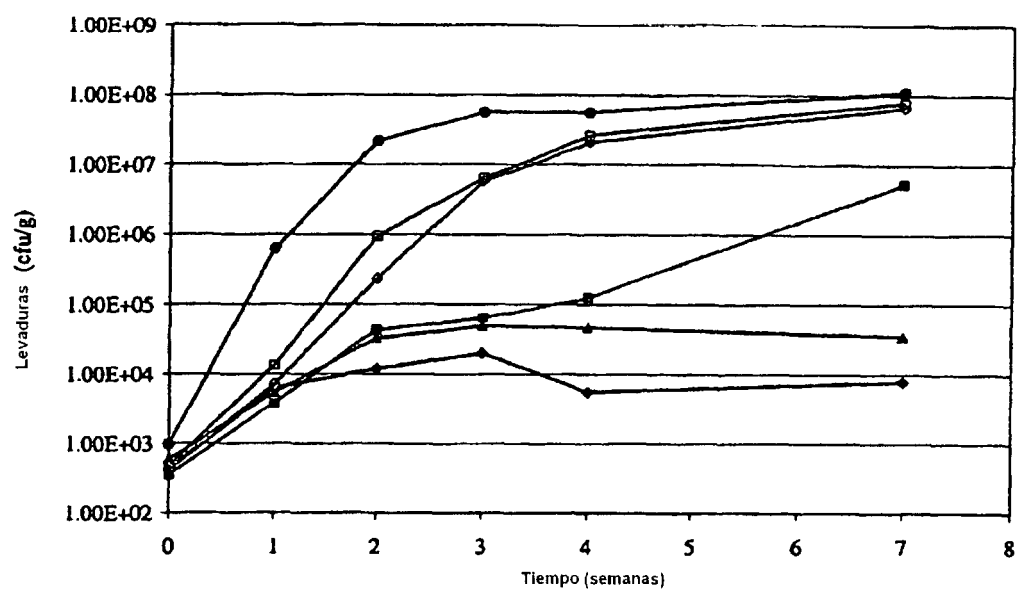
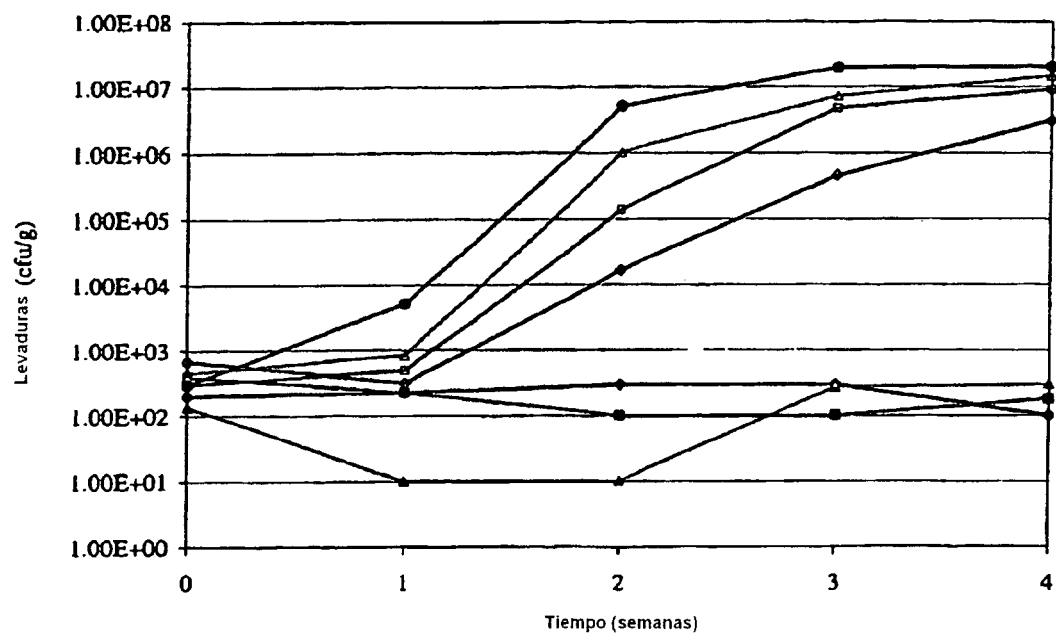


Fig. 4



ES 2 318 050 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Eidgenössische Technische Hochschule Zürich	
5	<120> Nuevo sistema biológico con actividades antimicrobianas para su utilización como sistema de conservación natural	
	<130> Mezcla de bacterias	
10	<140>	
	<141>	
15	<160> 11	
	<170> PatentIn Ver. 2.1	
20	<210> 1	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador PCR	
30	<400> 1	
	tggtcagaa cgaacgctag gcccg	25
35	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador PCR	
45	<400> 2	
	tgcactgaga ttcgacttaa	20
50	<210> 3	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador PCR	
60	<400> 3	
	caccgagatt caacatgg	18
65	<210> 4	
	<211> 20	

ES 2 318 050 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador PCR	
	<400> 4	
10	tgcatcttga ttaattttg	20
	<210> 5	
15	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador PCR	
	<400> 5	
25	aggaggtgat ccarccgca	19
	<210> 6	
30	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador PCR	
	<400> 6	
40	agtttgatcm tggctcag	18
	<210> 7	
45	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador PCR	
	<400> 7	
55	actcctacgg gaggcagc	18
	<210> 8	
60	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador PCR	

ES 2 318 050 T3

	<400> 8	
	accgcggctg ctggcac	17
5	<210> 9	
	<211> 22	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador PCR	
15	<400> 9	
	ggmttagata ccctggtagt cc	22
20	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador PCR	
30	<400> 10	
	cgttaagtcc cgcaacgagc	20
35	<210> 11	
	<211> 17	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador PCR	
45	<400> 11	
	gtacacaccg cccgtca	17
50		
55		
60		
65		