

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 916 398**

21 Número de solicitud: 202031317

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
A23L 3/3571 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
A23C 19/16 (2006.01)
B65D 81/28 (2006.01)
C12R 1/25 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

30.12.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.06.2022

Fecha de concesión:

23.03.2023

45 Fecha de publicación de la concesión:

30.03.2023

73 Titular/es:

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (60.0%)
Avda. Blasco Ibáñez, 13
46010 Valencia (Valencia) ES y
AIMPLAS ASOCIACION DE INVESTIGACION DE
MATERIALES PLASTICOS Y CONEXAS (40.0%)

72 Inventor/es:

MECA DE CARO, Giuseppe;
MAÑES VINUESA, Jordi;
LUZ MINGUEZ, Carlos;
RODRIGUEZ GARRIDO, Lorena;
SANTOMÉ ZUAZUA, Jezabel y
GOMEZ JIMÉNEZ, Lola

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

54 Título: **Cepa de *Lactobacillus plantarum*, uso como probiótico y producto bioactivo derivado de ella**

57 Resumen:

Cepa de *Lactobacillus plantarum* uso como probiótico y producto bioactivo derivado de ella.

Cepa de *L. plantarum*, uso probiótico de la misma mediante una cápsula gastrorresistente y producto bioactivo recubierto por una formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano obtenida mediante la fermentación del suero de leche mediante dicha cepa. Método de obtención de los mismos y uso alimentario del producto bioactivo, preferiblemente para inhibir el crecimiento de hongos en el queso.

ES 2 916 398 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
 Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Cepa de *Lactobacillus plantarum*, uso como probiótico y producto bioactivo derivado de ella

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a una cepa de *Lactobacillus plantarum* y al uso de la misma como probiótico y para obtener una formulación que comprende de suero de leche fermentado. Esta formulación se aplica a un film, separador o protector alimenticio, generando un producto bioactivo que previene el crecimiento de microorganismos a lo largo del almacenamiento del alimento en cuestión y prolongar su vida útil.

ANTECEDENTES

Según las últimas indicaciones de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), gran parte de las enfermedades degenerativas tienen su origen en la alimentación y por eso mismo, existe una demanda real, en cuanto a la reducción de uso de aditivos y empleo de técnicas de procesado de alimentos menos agresivas, con el objetivo de producir alimentos mínimamente procesados que reúnan las características organolépticas proporcionadas por el alimento fresco o tradicional así como probióticos beneficiosos para desplazar a los microorganismos nocivos para la salud y ayudar a la digestión.

Aunque está comprobado que el contenido de toxinas y de microorganismos patógenos presentes en alimentos se puede reducir empleando diversas técnicas físicas y biológicas, como tratamientos térmicos y fermentaciones por bacterias y levaduras; en la bibliografía científica existen pocos estudios que evalúen la reducción del contenido de toxinas o micotoxinas en los alimentos utilizando ingredientes activos de origen natural, a pesar del beneficio potencial para la salud de los consumidores que se podría obtener.

Por todo esto, la industria alimentaria presionada por las demandas del mercado se ve sometida al desarrollo de nuevos productos y procesos de transformación de alimentos para obtener productos seguros y que presenten las características deseadas por los consumidores. Un claro ejemplo de desarrollo se produce en la industria de la fermentación de los alimentos, donde los cultivos iniciadores juegan un papel muy importante en la elaboración del producto final, contribuyendo en la seguridad alimentaria y calidad organoléptica de estos.

Los probióticos son organismos, generalmente bacterias, que se consideran beneficiosos en lugar de perjudiciales para su huésped animal. El interés en los probióticos disminuyó con la llegada de los antibióticos. Sin embargo, con la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos, hay un renovado interés en las bacterias probióticas, que ahora se definen como "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped". Actualmente es un concepto popular que la acumulación de organismos probióticos en el intestino es beneficiosa para la salud general del organismo huésped y hay informes que indican que la administración de probióticos es útil en el mantenimiento de la salud alimentaria y la correcta digestión.

El documento *Use of whey fermented by lactic acid bacteria as a natural preservative with antifungal properties. in annals of nutrition and metabolism* (http://semipyp.es/pdf/workshop/workshop9_2018_abstracts.pdf) demuestra las características antimicrobianas del suero de leche fermentado por una bacteria ácido-láctica, pero no se hace referencia a ninguna aplicación práctica, la presente invención se refiere a una cepa específica, la cepa CECT30089 que presenta una concentración inhibitoria mínima y una concentración fungicida mínima dos veces inferiores a las del documento.

El documento científico García Ruiz et al, (2014) *Evaluación de las propiedades probióticas de bacterias lácticas de origen enológico*. Alim. Nutri. Salud, Vol. 21, N.º 2, pp. 28-34, 2014 divulga las propiedades probióticas de una serie de bacterias lácticas, sin embargo, la cepa de *L. plantarum* de la presente invención presenta mejores capacidades de adhesión a células intestinales y desplazamiento de microorganismos patógenos que las cepas divulgadas.

Satisfacer estas demandas significa un gran reto para la industria alimentaria, principalmente cuando las características deseadas son la eliminación de conservantes de síntesis con el fin de obtener productos más naturales y con mayor actividad antimicrobiana. Debido a esto, la bioconservación ha atraído la atención de la industria de alimentos como un sustituto potencial de los conservantes utilizados en la actualidad.

En los últimos años la bioconservación se está posicionando como un sustituto de los conservantes utilizados hoy por hoy, así como de los compuestos antimicrobianos y las soluciones absorbedoras, ya que presentan la ventaja de utilizar bacteriocinas producidas por bacterias consideradas benéficas para la salud en la conservación de los alimentos. Ha sido reportado que estos compuestos purificados o semipurificados

pueden ser utilizados como biopreservantes en alimentos para la reducción o eliminación de ciertos microorganismos de deterioro y algunos patógenos.

Las soluciones antimicrobianas comentadas anteriormente, presentan ciertas limitaciones en algunos casos, lo que explica la inserción baja de estas soluciones en mercado:

5

- otorgan olor y sabor al alimento: aceites esenciales, cinamaldehído.
- no son soluciones aprobadas para contacto alimentario por no estar recogidas en el listado de sustancias admitidas para su uso, según la regulación 10/2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos y 450/2009 sobre materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con alimentos, caso de ácido sórbico y éster de alginato láurico.
- no presentan la efectividad necesaria comparable a los aditivos sintéticos utilizados en la elaboración de un producto alimenticio envasados.

10

Los envases activos es un campo de aplicación que está actualmente en desarrollo. Estos pueden considerarse como envases en los cuales se han incluido deliberadamente componentes secundarios (agentes o elementos activos) para mejorar las condiciones de conservación del alimento y prolongar su vida útil. El envase participa activamente en la conservación del producto y en mantener o potenciar sus propiedades organolépticas, bien absorbiendo compuestos que deterioran el producto o bien emitiendo sustancias que ayudan a su conservación. Nos encontramos ante numerosas líneas de trabajo relacionadas; envases con absorbedores de oxígeno y de humedad, y envases aditivados con antimicrobianos y antioxidantes. Cada tipología de envase activo es útil para una o varias tipologías de producto alimentario.

15

20

Los envases activos, a diferencia de los envases tradicionales a los que se exige que sean totalmente inertes, están diseñados para interactuar de forma activa y continua con su contenido, su finalidad es ampliar el tiempo de conservación o mantener o mejorar el estado de los alimentos envasados. Su utilización, está cada vez más extendida, sobre todo en frutas, hortalizas, pescados y carnes.

25

De entre las diferentes tecnologías de envase activo que existen, podemos encontrar que en los envases de productos alimenticios comerciales la más extendida es el absorbedor de oxígeno, que contiene productos químicos que eliminan el oxígeno residual de la atmósfera que rodea el queso. La exposición al oxígeno puede provocar, entre otros, el crecimiento de moho y bacterias aerobias, así como cambios en la composición nutricional o cambios fisiológicos como el ratio de respiración.

30

Respecto a los envases para uso alimentario, en el caso específico del queso para uso alimentario, en el caso específico del queso, para facilitar su manipulación se suele utilizar un separador o film, que puede ser un film de papel o material polimérico, un material antiadherente que permite al consumidor final tomar una sola loncha sin que la misma se quede pegada a otra por acción de la grasa o humedad.

Los documentos de patente CN101747635A, WO2000049899A1, CN103351471A describen films monocapa para uso alimentario que comprenden exclusivamente proteínas de suero lácteo como caseína. Sin embargo, a diferencia de los documentos anteriores, el producto bioactivo de la presente invención está recubierto con la formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano obtenida a partir del producto de fermentación de una cepa bacterias ácido-lácticas que contiene además de proteínas como la caseína, un biocomplejo que comprende otros ácidos, péptidos y bacteriocinas, responsables del efecto antifúngico. Por lo que la presente invención tiene dos ventajas respecto a dichos documentos el aprovechamiento de un desecho de la industria que es el suero de leche (economía circular) y una mayor capacidad de inhibición fúngica debido a la mayor variedad de compuestos.

El artículo científico, Karimi et al, 2020, *Preparation and characterization of whey protein isolate/polydextrose-based nanocomposite film incorporated with cellulose nanofiber and L. plantarum: A new probiotic active packaging system*, divulga un film biodegradable hecho con polidextrosa que se recubre con proteínas de suero y no suero fermentado con bacterias ácido lácticas. En la presente invención, el material del envase activo es un plástico no biodegradable que incorpora una formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano que comprende suero de leche fermentado por bacterias ácido-lácticas. Además, la finalidad de ambos films es diferente, en el artículo científico la actividad antibacteriana del film se ha testado sobre microorganismos patógenos del tracto gastrointestinal, mientras que el film de la presente invención se ha probado contra patógenos fúngicos.

La presente invención se refiere a una cepa de *L. plantarum*, su uso como probiótico, mediante una cápsula gastroresistente, así como un método para producir un producto bioactivo con una formulación de recubrimiento antifúngico, los productos intermedios de dicho método y los usos del mismo. La invención presenta la ventaja de no tener que recurrir a los aditivos antimicrobianos sintéticos, que posiblemente a largo plazo pueden producir diferentes problemas a la salud del consumidor.

DESCRIPCIÓN

En la presente memoria, la expresión "bacterias ácido lácticas" (BAL) se refiere a bacterias de grado alimenticio que producen ácido láctico como el principal producto final metabólico de la fermentación de carbohidratos. Estas bacterias están relacionadas por características metabólicas y fisiológicas comunes y, por lo general, son bacilos o cocos gram positivos, con bajo contenido de guanina-citosina, tolerantes al ácido, no esporulantes, y en forma de bastón. Durante la etapa de fermentación, el consumo de azúcares por estas bacterias provoca la formación de ácido láctico y reduce el pH. Por lo tanto, estas bacterias son responsables de la acidificación y, en algunos casos (por ejemplo, en el caso de fermentaciones de leche) de la textura del producto fermentado. Este término abarca las bacterias de la cepa invención, la cepa CECT30089.

El término "leche" pretende abarcar leches de mamíferos, de fuentes vegetales o leche producida recombinantemente. Preferiblemente, la leche es de una fuente de mamífero. Las fuentes de leche de mamíferos incluyen, entre otras, vacas, ovejas, cabras, búfalos, camellos, llamas, yeguas y ciervos. En una realización, la leche es de un mamífero seleccionado del grupo que consiste en vaca, oveja, cabra, búfalo, camello, llama, yegua y ciervo, y una mezcla de leche de combinaciones de los mismos. Las fuentes vegetales de leche incluyen, entre otras, leche extraída de soja, guisante, maní, cebada, arroz, avena, quinua, almendras, anacardos, coco, avellanas, cáñamo, semillas de sésamo y semillas de girasol y combinaciones de los mismos. Además, el término "leche" se refiere no solo a la leche entera, sino también a la leche desnatada o cualquier componente líquido derivado de la misma.

El término "fermentación" en el presente documento se refiere a un proceso metabólico en el que los azúcares se convierten en ácidos, gases o alcohol. Preferiblemente, la fermentación comprende la conversión de lactosa en ácido láctico.

El término "cultivo iniciador" como se usa en el presente documento se refiere a una composición que comprende una o más bacterias ácido lácticas, que son responsables de la acidificación del sustrato de la fermentación. Las composiciones de los cultivos iniciadores pueden ser frescas (líquidas), congeladas o liofilizadas. Los cultivos liofilizados deben activarse antes de su uso.

Los términos "cultivo iniciador" e "inóculo" son sinónimos y se usan de forma intercambiable

El término "biocomplejo" es el conjunto de moléculas producidas por los microorganismos durante la fermentación del suero con actividad antimicrobiana.

En la presente invención la cepa "CECT30089" y "BN17" son términos intercambiables y se emplean indistintamente.

El término "antimicrobiano" en la presente memoria comprende los términos "antibacteriano y/o antifúngico".

- 5 En la presente invención los términos "comprimidos" y "cápsulas" son términos intercambiables y se emplean indistintamente.

La presente invención se refiere a una cepa de *Lactobacillus plantarum* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con número 30089 o mutantes derivados de la misma, en donde dichos mutantes tienen las mismas o mejores propiedades antimicrobianas, que la cepa CECT30089.

Esta cepa se depositó el 26 de febrero de 2020 en la Colección Española de Cultivos Tipo, Calle Catedrático Agustín Escardino, 9, CP46980, Paterna (Valencia), España según las disposiciones del Tratado de Budapest.

Los mutantes derivados de esta cepa se refieren a cepas que se derivan de CECT30089, u obtenidas de CECT30089, y pueden tener mutaciones en comparación con *Lactobacillus plantarum*, preferiblemente, la cepa mutante tiene las mismas o mejores propiedades antimicóticas que la cepa madre CECT30089. Preferiblemente, el mutante derivado de CECT30089 tiene al menos el 80% o más, preferiblemente al menos el 90% o más, más preferiblemente al menos el 95% o más o incluso hasta el 100% o más del 100% del efecto antimicrobiano en comparación con la cepa CECT30089 en condiciones iguales.

Las propiedades antimicrobianas se seleccionan entre propiedades antifúngicas, antibacterianas y combinaciones de ambas.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la cepa de *Lactobacillus plantarum* definida anteriormente, como inhibidor del crecimiento antimicrobiano en productos alimenticios.

Otro aspecto adicional de la invención se refiere al uso probiótico de la cepa de *Lactobacillus plantarum* definida anteriormente.

Otro aspecto adicional de la invención se refiere a una cápsula gastrorresistente para uso como probiótico que comprende la cepa de bacterias definidas anteriormente.

En una realización particular la cápsula gastrorresistente comprende leche de mamíferos, suero de leche de mamíferos, leche vegetal, suero de leche vegetal y combinaciones de los anteriores.

La leche se selecciona entre leche desnatada, semidesnatada, entera y combinaciones de los anteriores.

5 La cápsula gastrorresistente puede comprender al menos un aditivo, por ejemplo, saborizantes como sacarosa gelatina, celulosa, almidones, excipientes, como la maltodextrina, albúmina sérica bovina, aglutinantes, antiaglomerantes, conservantes y otros vehículos o ingredientes de administración farmacéuticamente aceptables para mejorar el sabor, la palatabilidad u otras propiedades organolépticas.

Estos aditivos pueden estar repartidos uniformemente por toda la cápsula o concentrados en al menos una parte concreta de la misma.

10 Las bacterias de la cepa CECT30089 pueden ser el único ingrediente probiótico, o el principal ingrediente probiótico de la cápsula gastrorresistente.

En una realización particular la cápsula gastrorresistente comprende leche desnatada, por ejemplo, leche desnatada ultrapasteurizada.

15 La leche desnatada es una fracción de la leche entera, que se obtiene cuando la grasa (nata) se elimina de la leche. La grasa de la leche está presente en la leche entera en forma de glóbulos, que están compuestos principalmente de triacilgliceroles y están rodeados por una membrana que consiste en lípidos complejos tales como fosfolípidos, junto con proteínas. Los lípidos de la leche son 97-98 % de triacilgliceroles, pequeñas cantidades de di- y monoacilgliceroles, ésteres libres de colesterol y colesterol, ácidos grasos libres y fosfolípidos. La leche entera de vaca comprende aproximadamente un 4
20 % de grasa láctea. La leche desnatada disponible comercialmente todavía puede tener un contenido bajo en grasa de leche de hasta el 0,3 %. Según la invención, el contenido de grasa de la leche desnatada es por ejemplo, inferior al 0,5 %, o puede ser inferior al 0,3 % o inferior al 0,1 %, o incluso de alrededor del 0 % en peso.

25 En otra realización adicional, la leche es leche semidesnatada. La leche semidesnatada puede comprender entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 2,5 % en peso de grasa láctea.

30 En otra realización adicional, la leche es entera. Esta leche contiene todos sus componentes. La leche entera se puede usar sin ningún tratamiento térmico. Sin embargo, la leche entera también se puede usar después de la pasteurización y/u homogeneización. Alternativamente, se puede usar leche entera deshidratada o leche entera en polvo. La leche entera deshidratada o la leche entera en polvo generalmente se obtienen al eliminar el agua de la leche entera pasteurizada y homogeneizada. En esta forma de realización, la cápsula gastrorresistente puede comprender entre

aproximadamente 2,5 y aproximadamente 6 %, por ejemplo, entre aproximadamente 3 y 5 % en peso de grasa láctea. La leche semidesnatada y la leche entera comprenden leche desnatada como una fracción de la misma. En general, la cápsula puede comprender entre 0 y 6 % en peso de grasa láctea. La leche puede ser leche UHT (leche
5 ultrapasteurizada). La leche desnatada, la leche semidesnatada o la leche entera pueden proporcionarse como un polvo, que se redisuelve en la composición. La leche desnatada puede diluirse, preferiblemente con agua o un tampón. En esta realización, la cápsula puede comprender del 10 al 95 %, por ejemplo, del 20 al 80 % de leche desnatada

10 La leche puede ser de origen vegetal, las concentraciones de grasa en leche de origen vegetal pueden ser inferiores a las de origen animal.

La concentración de bacterias en la cápsula gastrorresistente para uso probiótico se encuentra comprendida en el intervalo de entre 5% a 50% en peso, más preferentemente entre 10% y 40%, aún más preferentemente 15% y 30%.

15 La cantidad de bacterias en la cápsula gastrorresistente está entre 10^4 y 10^{15} , preferiblemente entre 10^6 y 10^{13} , más preferiblemente entre 10^8 y 10^{12} células, más preferiblemente entre 10^9 y 10^{11} células. El número de células se puede determinar mediante métodos conocidos, por ejemplo, con un contador de células.

El uso probiótico es preferentemente gastrointestinal, y puede usarse en humanos y/o
20 animales, preferentemente humanos.

El efecto probiótico de la cepa CECT30089 comprende efecto antimicrobiano, preferentemente efecto antifúngico y/o antibacteriano.

En una realización particular los microorganismos afectados son microorganismos patógenos, por ejemplo, *Candida* spp., *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogenes*,
25 *Salmonella entérica*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, y/o *Yersinia enterocolitica*.

Método de uso que comprende administrar una composición que comprende bacterias de la cepa CECT30089 y una cápsula gastrorresistente a un sujeto.

Otro aspecto adicional de la invención se refiere a un formulado antimicrobiano que
30 comprende el producto de la fermentación de un sustrato por la cepa descrita anteriormente del cual se han separado las bacterias.

Algunos ejemplos de sustancias bioactivas antimicrobianas que contiene el formulado antimicrobiano son los ácidos orgánicos y fenólicos, los péptidos bioactivos,

bacteriocinas, caseína, y biocomplejos de moléculas responsables de la actividad antifúngica y antibacteriana: el ácido fenil láctico (PLA), en concentraciones superiores a los 200 mg/L, y de otros 19 diferentes compuestos entre ellos, los ácidos ferúlico, cafeico, siríngico, benzoico, gálico etc, con concentraciones variables entre 10 y 250 mg/L.

El sustrato de la fermentación puede ser leche, suero de leche y/o combinaciones de ambos en cualquier proporción, preferentemente suero de leche.

El sustrato de la fermentación se selecciona entre leche de mamíferos, suero de leche de mamíferos, leche vegetal, suero de leche vegetal y combinaciones de los anteriores. Preferentemente la leche o suero de leche de mamíferos puede provenir de vacas, ovejas, cabras, búfalos, camellos, llamas, yeguas, ciervos y mezclas de leche de los anteriores, más preferentemente vacas, ovejas, cabras y combinaciones de los anteriores. La leche o suero de leche vegetal puede provenir de soja, guisante, maní, cebada, arroz, avena, quinua, almendras, anacardos, coco, avellanas, cáñamo, semillas de sésamo, semillas de girasol y de combinaciones de los anteriores.

En una realización particular se emplea suero de leche de leche de vaca, oveja, cabra o combinaciones de los anteriores

En una realización preferida se emplea suero de leche de leche de cabra.

El suero de leche puede ser suero dulce o suero ácido, el primero se obtiene mediante coagulación enzimática de las caseínas de la leche y el segundo por coagulación ácida. En una realización particular se emplea suero de leche dulce.

El suero de leche es un material de desecho de la industria láctica y se obtiene siguiendo un método conocido en el estado de la técnica.

Otro aspecto adicional de la invención se refiere a un método para producir el formulado antimicrobiano anteriormente descrito que comprende las siguientes etapas:

- a. Fermentar el sustrato con un cultivo iniciador que comprende al menos una cepa de bacterias ácido lácticas descritas anteriormente y
- b. al finalizar la fermentación separar las bacterias ácido lácticas del paso a) por centrifugación.

El sustrato de la fermentación se selecciona entre leche, suero de leche y combinaciones de ambos en cualquier proporción, preferentemente suero de leche.

El formulado antimicrobiano comprende efecto antifúngico y/o antibacteriano.

El sustrato se puede fermentar a una temperatura comprendida entre 4 y 50°C preferentemente, entre 10 y 49°C, más preferentemente entre 15 y 48°C, aún más preferentemente entre 20 y 47°C y aún más preferentemente 30 y 45°C durante un intervalo de tiempo comprendido entre 20 y 96 horas.

- 5 En una realización particular, el sustrato se puede pasteurizar previamente para eliminar los microorganismos presentes que pudieran interferir con el proceso de fermentación posterior. La pasteurización se puede realizar siguiendo las condiciones habituales del campo de la técnica.

10 El cultivo iniciador puede activarse previamente a la fermentación mediante una incubación en el mismo sustrato que en el que se va a realizar posteriormente la fermentación empleando condiciones de tiempo y temperaturas habituales en el área. Tras la activación del cultivo iniciador, el escalado al sustrato que se va a fermentar se puede realizar en una proporción comprendida en el intervalo entre 1:80 y 1:120 volumen del cultivo inicial : volumen del sustrato a fermentar.

- 15 La concentración inicial del cultivo iniciador en la etapa a) del método es de 10^4 a 10^{12} (Unidades Formadoras de Colonias por ml) UFC/ml del inóculo, preferiblemente entre 10^8 y 10^{10} UFC/ml del inóculo.

Al finalizar la fermentación se realiza una centrifugación para eliminar las bacterias del suero de leche fermentado.

- 20 En otra realización particular, el formulado antimicrobiano se puede liofilizar tras la etapa de separación de las bacterias. La liofilización se puede realizar siguiendo cualquier protocolo del estado de la técnica.

Otro aspecto adicional de la invención se refiere un método de obtención de un producto bioactivo que comprende las siguientes etapas:

- 25 a) preparación de una disolución del formulado antimicrobiano
b) disolución de al menos una matriz polimérica en agua
c) mezcla del producto de la etapa a) con el producto de la etapa b) para obtener una formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano y
d) aplicar la formulación obtenida en la etapa c) sobre un material, para obtener un
30 producto bioactivo.

Previamente a la obtención de la formulación de recubrimiento, el formulado antimicrobiano se disolvió en agua, (etapa a) mediante agitación magnética durante un intervalo de tiempo entre 12 y 36 horas hasta la completa disolución. Las condiciones

de la disolución del formulado antimicrobiano pueden variar para favorecer su completa disolución: se puede emplear con calor, hasta un máximo de 40°C y agitación, hasta un máximo de 800 (revoluciones por minuto) rpm. Un experto en la materia sabría escoger las condiciones idóneas para esta etapa.

- 5 Las disoluciones de la etapa a) pueden presentar una concentración de entre el 1% al 40% de formulado antimicrobiano en agua, preferentemente de entre el 5% al 30%, aún más preferentemente de entre el 10% al 35%. La concentración depende de la solubilidad del suero. Según el sustrato de partida podrá obtener una solubilidad mayor o menor. Cuanto más elevado sea el contenido proteico menos soluble será. Cuanto
- 10 más elevada sea la concentración del formulado antimicrobiano en agua, más elevada será su viscosidad.

En una realización particular la concentración del formulado antimicrobiano es de entre el 20% al 25%.

- 15 La matriz polimérica de la etapa b) debe ser una matriz polimérica apta para el contacto alimentario, preferentemente alcohol de polivinilo (PVOH), copolímeros de Etilen-Vinil-Alcohol (EVOH), copolímeros acrílico-estireno, resinas acrílicas, dispersiones acuosas aniónicas, dispersiones acuosas, resinas de poliuretano alifático, copolímeros acrílico-uretano, poliuretanos, resinas alquídicas, PVC, acetato de polivinilo, nitrocelulosa, butirato de polivinilo (PVB), poliéster (PET), acrilatos de poliéster, uretanos, quitosano,
- 20 alginatos, hidroxipropilmetil celulosa, (HPMC), almidón, soluciones de polientilenglicol aminoplásticos, polisacáridos, ácidos grasos, proteínas, ceras, gomas, colágeno, pectinas, gelatinas y composites.

- Las disoluciones de la etapa b) pueden presentar una concentración del 0,01% al 40% de la matriz polimérica en agua, preferentemente entre un 0,5% y un 35%, más
- 25 preferentemente entre un 1% y un 30%, aún más preferentemente entre un 2% y un 25% y aún más preferentemente entre un 5% y un 20%.

- Como cualquier experto en la materia reconocerá, dependiendo del tipo de matriz polimérica se podrá alcanzar una concentración más o menos elevada. Por ejemplo, en el caso de alginato o quitosano una concentración en agua del 2% ya es una
- 30 concentración muy elevada, en cambio, las matrices poliméricas de fuentes fósiles o resinas acrílicas permiten una concentración más elevada.

La concentración está estrechamente vinculada con la viscosidad de la matriz, en la presente solicitud la viscosidad se ha medido con una copa Ford IV.

Las etapas a) y b) se pueden realizar simultáneamente o en cualquier orden.

El producto de la etapa c), puede presentar una concentración del 1% al 25% del producto de la etapa a) en la b).

Se incorpora el formulado antimicrobiano a la matriz polimérica disuelta a una temperatura de entre 20 a 50°C, ya que en el caso de elevar la temperatura en exceso la formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano puede perder las propiedades antimicrobianas. La incorporación de formulado antimicrobiano se realiza a una agitación de entre 500-1000 rpm. Una agitación vigorosa puede formar espuma que dificulte posteriormente su aplicación. Para asegurar la homogeneidad del recubrimiento antimicrobiano, se mantiene la agitación entre 1 y 12 horas. A continuación, se acidifica la disolución hasta que el pH se encuentre en el intervalo de 2 y 5, se puede emplear cualquier ácido apto para uso alimentario, preferentemente un ácido débil, más preferentemente ácido láctico. Este ácido puede encontrarse en el sustrato de partida.

El ajuste del pH a dichos valores es importante para la actividad de las moléculas antimicrobianas del biocomplejo.

En una realización particular, las etapas a) y c) pueden realizarse simultáneamente, esto es, añadir el formulado antimicrobiano a la matriz polimérica disuelta.

En otra realización particular es necesario regular el pH a un intervalo entre 2 y 5, preferiblemente 3, o el pH que tuviera el formulado antimicrobiano tras la fermentación con la cepa CECT30089.

En una realización particular el pH se regula mediante la adición de un ácido, por ejemplo, ácido acético, láctico, málico, fumárico, cítrico, succínico, ascórbico, fórmico, fosfórico, sórbico, tartárico, adípico, y/o nicotínico.

En otra realización particular, la etapa c) comprende la incorporación del producto de la etapa a), esto es, la disolución del formulado antimicrobiano a una matriz polimérica en solución acuosa, al producto de la etapa b).

En otra realización particular, la etapa c) comprende la incorporación del producto de la etapa b) al producto de la etapa a)

En otra realización particular, las etapas a), b) y c) pueden realizarse simultáneamente.

Opcionalmente se pueden añadir al menos un aditivo necesario para asegurar la correcta aplicación posterior sobre el material seleccionado. Entre los aditivos podemos señalar:

- surfactantes o tensioactivos, por ejemplo, sólidos hidrófobos sin siliconas, polisiloxanos y soluciones acuosas de polisiloxanos, polidimetilsiloxano modificado con polieter, aceites a base de parafinas, polisiloxanos en poliglicol, sales de alquilamonio y polimetilalquilsiloxano.

5 - aditivos reológicos, soluciones de urea modificada, solución de un poliuretano hidrofóbico modificado, poliuretanos, solución polietilenglicol aminoplástico, derivados del aceite de ricino, soluciones de urea modificada, soluciones de amidas de ácido polihidroxicarboxílico, soluciones de poliuretano con urea, poliamidas de polaridad media modificadas con urea, éster de ácido policarboxílico, y solución de oligoamidas
10 funcionales amina,

- ácidos alimentarios como el acético, láctico, málico, fumárico, cítrico, succínico, ascórbico, fórmico, sórbico, tartárico, adípico, nicotínico y fosfórico, preferentemente fosfórico.

Los surfactantes y promotores de adhesión empleados dependen de la matriz polimérica
15 empleada, un experto en la materia conocería que combinación concreta de aditivos con matrices poliméricas se pueden emplear.

Los aditivos añadidos no excederán el 15% del volumen total de la formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano, preferentemente el porcentaje no será superior al 10% del volumen total de la formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano.

20 En la etapa d) La aplicación de la formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano como recubrimiento sobre el material para obtener un producto bioactivo se puede realizar con un equipo de impresión o aplicación de recubrimientos a escala laboratorio o a escala industrial mediante tecnologías de impresión convencional, como son la flexografía o el huecograbado o spray.

25 El empleo de cualquiera de las tecnologías indicadas en el párrafo anterior se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante del equipo o cualquier protocolo conocido en el campo de la técnica.

El material sobre el que se aplica la formulación de recubrimiento se selecciona entre plástico, preferentemente PE (polietileno), polipropileno (OPP), tereftalato de
30 polietileno (PET), polietileno de baja densidad (LDPE), polietileno de alta densidad (HDPE), Etilen-Vinil-Alcohol (EVOH), papel y etilvinilacetato (EVA), almidón de maíz, polipropileno (PP), polipropileno modificado mediante polimerización fotoiniciada de

ácido acrílico (PP-g-PAA), ácido poliláctico (PLA), policloruro de vinilo (PVC), quitosano, gelatina de pescado, celulosa, papel y combinaciones de estos.

Este material puede ser cualquier producto o envase apto para introducir alimentos en él, preferentemente un film y/o un separador.

- 5 Una vez que se ha aplicado la formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano sobre el material se obtiene el producto bioactivo.

Las bacterias se eliminan al finalizar el proceso de fermentación, por lo cual, ni el formulado antimicrobiano, ni la formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano ni el producto bioactivo final contienen microorganismos.

- 10 En una realización particular se puede aplicar una solución primer promotor de la adhesión sobre el material antes de aplicar la formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano. La ventaja de aplicar esta primera capa de recubrimiento es una mejora en la capacidad de adhesión de la formulación de recubrimiento sobre el material y por lo tanto permite emplear menos cantidad de formulado antimicrobiano en la formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano para la segunda aplicación del recubrimiento abaratando así el procedimiento.

- La solución primer puede ser la misma o diferente matriz polimérica empleada en la formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano, por ejemplo, alcohol de polivinilo (PVOH), copolímeros de Etilen-Vinil-Alcohol (EVOH), copolímeros acrílico-estireno, resinas acrílicas, dispersiones acuosas aniónicas, dispersiones acuosas, resinas de poliuretano alifático, copolímeros acrílico-uretano, poliuretanos, resinas alquídicas, PVC, acetato de polivinilo, nitrocelulosa, butirato de polivinilo (PVB), poliéster (PET), acrilatos de poliéster, uretanos, quitosano, alginatos, hidroxipropilmetil celulosa, (HPMC), almidón, soluciones de polientilenglicol aminoplásticos, polisacáridos, ácidos grasos, proteínas, ceras, gomas, colágeno, pectinas, gelatinas y composites

- Ha de disolverse en agua o cualquier otro solvente aprobado para contacto alimentario y puede presentar una concentración del 0,01% al 40% de la solución de recubrimiento o primer en el solvente, preferentemente entre un 0,5% y un 35%, más preferentemente entre un 1% y un 30%, aún más preferentemente entre un 2% y un 25% y aún más preferentemente entre un 5% y un 20%.

y su aplicación sobre el material puede ser mediante tecnologías de impresión convencional, como son la flexografía o el huecograbado o spray.

Un objeto adicional de la invención se refiere a una formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano obtenida a partir de fermento láctico de la cepa de CECT30089 que comprende una matriz polimérica disuelta en agua. Esto es, el producto intermedio de la etapa c) del método de obtención de un producto bioactivo.

- 5 La matriz polimérica se selecciona entre alcohol de polivinilo (PVOH), copolímeros de Etilen-Vinil-Alcohol (EVOH), copolímeros acrílico-estireno, resinas acrílicas, dispersiones acuosas aniónicas, dispersiones acuosas, resinas de poliuretano alifático, copolímeros acrílico-uretano, poliuretanos, resinas alquídicas, PVC, acetato de polivinilo, nitrocelulosa, butirato de polivinilo (PVB), poliéster (PET), acrilatos de políester, uretanos, quitosano, alginatos, hidroxipropilmetil celulosa, (HPMC), almidón, 10 soluciones de polientilenglicol aminoplásticos, polisacáridos, ácidos grasos, proteínas, ceras, gomas, colágeno, pectinas, gelatinas y composites.

- Otro objeto adicional de la invención se refiere a un producto bioactivo obtenido por el método descrito anteriormente que comprende una formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano y un material. 15

- El material se selecciona entre plástico, preferentemente PE (poletileno), polipropileno (OPP), tereftalato de polietileno (PET), polietileno de baja densidad (LDPE), polietileno de alta densidad (HDPE), Etilen-Vinil-Alcohol (EVOH), papel y etilvinilacetato (EVA), almidón de maíz, polipropileno (PP), polipropileno modificado mediante polimerización 20 fotoiniciada de ácido acrílico (PP-g-PAA), ácido poliláctico (PLA), policloruro de vinilo (PVC), quitosano, gelatina de pescado, celulosa, papel y combinaciones de estos.

El producto bioactivo puede ser un envase bioactivo, film bioactivo y/o separador bioactivo. Puede ser cualquier recipiente siempre que esté recubierto con la formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano.

- 25 En una realización adicional el producto bioactivo puede presentar la forma de una lámina, un film y/o un envase, preferentemente un film.

Otro aspecto adicional de la invención se refiere al uso del producto bioactivo como inhibidor del crecimiento antimicrobiano de productos alimenticios.

- En una realización particular se puede usar el producto bioactivo como inhibidor del 30 crecimiento fúngico en productos alimenticios

El producto bioactivo ha de estar en contacto directo con el producto alimenticio.

Los productos alimenticios pueden ser productos lácteos y preferiblemente queso.

En una realización particular el producto bioactivo inhibe el crecimiento de las especies de hongos seleccionadas entre *P. camemberti*, *P. expansum*, *P. roqueforti*, *P. brevicopactum*, *P. commune*, *P. verrucosum* y combinaciones de los anteriores.

5 Salvo que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto ordinario en la materia a la que pertenece esta invención. En la práctica de la presente invención se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos. A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones, la palabra "comprender" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos,
10 componentes o pasos. Los objetos, ventajas y características adicionales de la invención se harán aparentes a los expertos en la materia al examinar la descripción o podrán aprenderse mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a título ilustrativo y no pretenden limitar la presente invención.

Breve descripción de las figuras

15 **Figura 1.** Recuento de *Lactobacillus plantarum* BN17 durante la digestión gastrointestinal. Las horas 1 y 2 simulan las condiciones de la digestión estomacal, 3-5 en el intestino delgado y las 24hr simulan la digestión en el colon, intestino grueso. En cada condición figura el error estándar (SEM).

Figura 2. Viabilidad de *Lactobacillus plantarum* BN17 en cápsula gastroresistente
20 durante 21 días almacenado a 20 °C.

Figura 3. Recuento de *Lactobacillus plantarum* BN17 encapsulado y liofilizado durante la digestión gastrointestinal. Las horas 1 y 2 simulan las condiciones de la digestión estomacal, 3-5 en el intestino delgado y las 24hr simulan la digestión en el colon, intestino grueso. En cada condición figura el error estándar (SEM).

25 **Figura 4:** Electroforesis SDS PAGE de las proteínas del suero de leche fermentado por las Bacterias ácido lácticas, BALs. M=Marcador de alto peso molecular, m=marcador de bajo peso molecular, a= control, b= cepa BN16, c= cepa E4, d= cepa BN17. α -LA= Alfalactoalbúmina, β -LG=Betalactoglobulina.

Figura 5: Imagen representativa del efecto inhibitorio de la cepa BN17 sobre *Penicillium*
30 *spp.* (5 especies) en una placa de cultivo.

Figura 6: Impresión sobre PET de la formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano PRO19-0073-01-01.

Figura 7: Ensayo de actividad del producto bioactivo en queso en lonchas mozzarella. (A) Queso control contaminado con *P. commune* (B) Queso contaminado con *P. commune* y tratado con un film bioactivo.

Figura 8. Recuento de la microflora fúngica de las muestras de queso a) inoculadas con *Penicillium commune* y b) contaminadas de forma natural y tratadas con el producto bioactivo de la invención. El Test estadístico empleado es ANOVA Tukey con un valor de significatividad $p < 0,01$.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

10 Obtención de las cepas de *L. plantarum*

Los microorganismos se aislaron de tomate *cherry* proveniente del laboratorio de toxicología de la Universidad de Valencia. Para fines de identificación, la levadura y las bacterias se cultivaron en agar papa dextrosa (PDA) y agar Man Rogosa y Sharpe MRS, respectivamente. La identificación microbiana se llevó a cabo mediante amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación posterior de los genes de referencia con fines taxonómicos. Primero, el ADN genómico se extrajo de cultivos de 24 h, usando el kit de preparación de ADN de levadura o bacterias (Jena Bioscience) para levadura y bacterias, respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cebadores empleados están diseñados para el gen 16S rADN, (Ramos-Izquierdo, et al, *Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical*) Los productos amplificados se examinaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p / v) con Safeview Nucleic Stain (NBS Biologicals) y se purificaron con mi_PCR Purification Kit (Metabion) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuencia se realizó mediante los reactivos ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready y el secuenciador ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems) en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia. Las secuencias se corrigieron manualmente para los artefactos de secuenciación antes de compararlas con las secuencias disponibles públicamente en GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) y el sitio web de CBS-KNAW (www.cbs.knaw.nl) para levadura y EzTaxon y BLAST para bacterias.

El análisis del ARN 16S de las bacterias aisladas de muestras de tomate provenientes del laboratorio de toxicología, evidenció que todas ellas pertenecen al género *Lactobacillus* y especie *plantarum*. Todas las bacterias aisladas y que se han utilizados en el estudio presentaban características genéticas diferentes aun perteneciendo a la misma especie, y han sido catalogadas como cepas diferentes de *Lb. plantarum*. Los

microorganismos que pertenecen a este género y especie son ampliamente utilizados en la biotecnología agroalimentaria debido a su extraordinaria versatilidad. De todas las cepas aisladas se procedió a realizar experimentos funcionales con la cepa depositada CECT30089 o BN17

5 **Caracterización de las propiedades probióticas de las bacterias de la cepa CECT30089**

Se realizaron ensayos de caracterización de las propiedades probióticas de la bacteria *Lactobacillus plantarum* BN17. Los estudios se focalizaron en la determinación de la viabilidad bacteriana a diferentes condiciones de pH ácido y concentraciones elevadas de sales biliares, capacidad de la adhesión a las células CACO-2/TC7, reducción de la adhesión de *Salmonella* y actividad antibacteriana frente a patógenos del tracto gastrointestinal. Estos experimentos se realizaron de forma independiente.

En la Tabla 1, se evidencian porcentajes de viabilidad de *Lactobacillus plantarum* BN17 a pH ácido (2,5-4,5) en un intervalo del 89- 158 %. A pHs 3; 3,5; 4 y 4,5 hay un incremento de bacterias en comparación con el inóculo inicial.

Los resultados de tolerancia a las sales biliares (*Bile extract porcine*, Referencia B8631 (Sigma-Aldrich) muestran que las bacterias de la cepa CECT30089 pueden resistir la presencia de estos compuestos, es más, a concentraciones de hasta 2% de sales biliares en el medio de cultivo sigue habiendo crecimiento. A partir de concentraciones de 2% de sales biliares hay una viabilidad cercana al 90% en comparación con el inóculo inicial, Tabla 1.

Tanto la viabilidad bacteriana a diferentes pHs como la resistencia a sales biliares se determinaron siguiendo un protocolo habitual en el área.

En cuanto a los ensayos con células CACO-2/TC7, las bacterias de la invención evidencian un % de adhesión del 6,5 % y una capacidad de reducir la adhesión de *Salmonella* a las células CACO-2/TC/ de un 80 % (% Adhesión= [Bacterias adheridas/Total de bacterias inoculadas] x 100, Tabla 1.

El protocolo del experimento se adaptó a partir del descrito en la patente EP2734057B2 brevemente: Se cultivaron células de adenocarcinoma humano CACO-2/TC7 en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con FCS (*Fetal Calf Serum*) al 10 %, L-glutamina 2 mM y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina en placas de cultivo de tejidos de 12 pocillos a una densidad inicial de 3×10^5 células/pocillo. Después de 3 días de cultivo, el medio se reemplazó con DMEM libre de antibióticos y se agregaron bacterias de la cepa de la invención a una MOI (*multiplicity of infection*) de 30. Las placas

se prepararon por duplicado (cada una contenía 3 pocillos/tratamiento replicados) y después de 4 horas de incubación a 37 °C con 5 % de CO₂, se lisó un conjunto de células con PBS (tampón fosfato salino) que contenía Triton X-100 al 1 % y se contó el número de bacterias vivas utilizando el procedimiento de Miles y Misra para obtener el número total de bacterias. Para obtener el número de bacterias que habían invadido las células epiteliales, el segundo conjunto de células se trató con PBS que contenía 100 pg/ml de gentamicina durante 2 horas a temperatura ambiente antes de ser lisadas y contadas las bacterias.

Además, *Lactobacillus plantarum* BN17 muestra actividad frente a hongos y bacterias patógenos del tracto gastrointestinal como *Candida* spp., *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella entérica*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, y *Yersinia enterocolitica*. Tabla 1. La capacidad antimicrobiana se testó mediante la prueba de halos de inhibición, siguiendo un protocolo habitual para un experto en la materia.

Tabla 1. Caracterización de las propiedades probióticas de *Lactobacillus plantarum* cepa BN17

| | | | | | |
|--|--------------------------------|-----------------|-----------------|-------------|---------------|
| Viabilidad a pH ácido (%) | pH 2,5 | pH 3 | pH 3,5 | pH 4 | pH 4,5 |
| | 88,6 | 100,7 | 108,7 | 150,3 | 157,7 |
| Tolerancia a las sales biliares (%) | 0,5% Bilis | 1% Bilis | 2% Bilis | | |
| | 116,1 | 102,7 | 86,6 | | |
| Adhesión a células CACO-2/TC-7 (%) | 6,5 | | | | |
| Reducción de la adhesión de <i>Salmonella</i> (%) | 80 | | | | |
| Actividad antimicrobiana contra patógenos | <i>Candida parapsilopsis</i> | | +++ | | |
| | <i>Candida glabrata</i> | | ++ | | |
| | <i>Candida albicans</i> | | +++ | | |
| | <i>Candida guilliermondi</i> | | ++ | | |
| | <i>Candida krusei</i> | | ++ | | |
| | <i>Candida metapsilosis</i> | | ++ | | |
| | <i>Candida auris C</i> | | ++ | | |
| | <i>Candida auris K</i> | | +++ | | |
| | <i>Candida auris I</i> | | ++ | | |
| | <i>Candida auris B</i> | | +++ | | |
| | <i>Shigella dysenteriae</i> | | +++ | | |
| | <i>Listeria monocytogenes</i> | | +++ | | |
| | <i>Salmonella enterica</i> | | +++ | | |
| | <i>Escherichia coli</i> | | +++ | | |
| | <i>Clostridium perfringens</i> | | +++ | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | | +++ | | | |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | | +++ | | | |

La European Food Safety Authority (EFSA) exige que los microorganismos que son empleados para producir determinados alimentos, o que se encuentran en estos, así como para uso probiótico, no deben tener resistencias ante determinados antimicrobianos de importancia clínica. En la Tabla 2, podemos evidenciar los resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de microgramos de antibióticos por ml de medio *Luria Bertani*, siguiendo el protocolo descrito por la EFSA: *EFSA Journal* 2012;10(6):2740. La bacteria *Lactobacillus plantarum* BN17 no supera los valores de CMI recomendados por la EFSA para cada uno de los antibióticos.

10 **Tabla 2.** Determinación de la resistencia a antibióticos de la bacteria *Lactobacillus plantarum* BN17.

| Antibiótico | Concentración mínima inhibitoria (µg/ml) |
|--------------|--|
| Ampicilina | 1 |
| Clindamicina | 2 |
| Eritromicina | <0,25 |
| Gentamicina | <0,25 |
| Estreptomina | 4 |
| Clorafenicol | 8 |
| Vancomicina | 32 |
| Tetraciclina | 32 |
| Kanamicina | 8 |

El siguiente paso fue simular el recorrido fisiológico por el tracto digestivo. Las bacterias de la cepa CECT30089 muestran una viabilidad a la digestión gastrointestinal simulada (Figura 1), obteniendo recuentos al final de la digestión de 8 log₁₀ UFC/mL.

15 Protocolo del estudio de resistencia al tracto gastrointestinal de *Lactobacillus plantarum* BN17 mediante un modelo de digestión dinámica in vitro

La digestión dinámica in vitro se llevó a cabo en el biorreactor Minifors (*Bottmingen*, Suiza). Previamente a comenzar la digestión, se calibró el pH-metro y llenamos el recipiente del biorreactor con 940 mL de medio MRS B (*Man Rogsa y Sharpe*) y 60 mL de saliva artificial, y se autoclavó en un aparato de autoclave Selecta (Barcelona, España) a 121°C durante 21 minutos. A continuación, se dejó enfriar hasta 37°C, ajustamos el pH a 7 y la rotación de las palas a 50 rpm.

20 A continuación, añadimos al biorreactor o bien 10 mL de un cultivo de 24 h a 37°C de *Lactobacillus plantarum* BN17. A fin de simular las condiciones del estómago, ajustamos el pH del biorreactor a 2, y añadimos la solución de pepsina (5 mL). Tras incubar 2 horas,

aumentamos el pH a 6,5 y añadimos las soluciones de pancreatina y sales biliares (12,5 mL), incubando 24 h.

A lo largo del proceso se toman muestras en varias ocasiones: inmediatamente tras añadir el inóculo (0 h), pasadas 1 y 2 h (condiciones estomacales) y pasadas 3, 4, 5 y
5 24 h tras añadir el inóculo (condiciones intestinales). Se toman de 2 a 3 mL con jeringuilla, se realizan diluciones seriadas con agua de peptona que posteriormente se siembran en placas petri con MRS Agar para el recuento de viables.

Los reactivos empleados se prepararon de la siguiente manera: para la pepsina se diluyó 1 g de pepsina en 25 mL de HCl 0,1 N, la solución de pancreatina y sales biliares
10 se preparó diluyendo 0,1 g de pancreatina y 0,625 g de sales biliares en 25 mL de NaHCO₃ 0,1 N. La saliva artificial se preparó a partir de una solución de 10 mL de KCl 89,6 g/L, 10 mL de KSCN 20 g/L, 10 mL de NaH₂PO₄ 88,8 g/L, 10 mL de NaSO₄ 57 g/L, 1,7 mL de NaCl 175,3 g/L, 20 mL de NaHCO₃ 84,7 g/L, 8 mL de urea 25 g/L, 290 mg de amilasa y 25 mg de mucina. Una vez mezclado ajustamos el pH a 6,8 y añadimos agua
15 destilada hasta llegar a 500 mL.

Protocolo elaboración cápsula gastrorresistente con *Lactobacillus plantarum* BN17

Para realizar el liofilizado para introducir en la cápsula, partimos de un cultivo de *Lactobacillus plantarum* BN17 a 37°C durante 24 h en MRS broth. Una vez finalizada la incubación, se vertió el contenido en tubos de 15 mL y se centrifugaron a 4000 rpm
20 durante 10 minutos, el pellet se lavó con 2 mL de PBS y se centrifugó de nuevo. Finalmente, las bacterias se suspendieron en leche desnatada ultrapasteurizada (UHT) al 20%, y a una suspensión final de bacterias comprendida entre 10⁴ y 10¹⁵ UFC/mL, se congelaron a -80°C y se liofilizaron durante 72 h en el liofilizador FreeZone 2.5 L (Labconco, Kansas City, MO, USA). Una vez obtenido el liofilizado de *Lactobacillus*
25 *plantarum* BN17, se procedió a la preparación de las cápsulas mediante el empleo de una encapsuladora manual de 100 cápsulas siguiendo un protocolo habitual del estado de la técnica.

Tras los estudios de viabilidad del probiótico liofilizado y conservado en cápsula gastroresistente (Figura 2) podemos observar un recuento de viables constante durante
30 21 días de almacenamiento a 20 °C. Por lo tanto, la estabilidad de *Lactobacillus plantarum* BN17 liofilizada y encapsulada durante un periodo largo de tiempo está garantizada.

Además, se repitió el protocolo descrito anteriormente de resistencia al tracto gastrointestinal, pero esta vez empleando o la cápsula con *Lactobacillus plantarum*

BN17 liofilizada. Este experimento evidenció una liberación de la bacteria del interior de la cápsula tras 3 h de digestión, alcanzando recuentos al final de la misma de 14 log₁₀ UFC/mL (Figura 3). Rendimientos superiores que al administrar las bacterias sin encapsular (Figura 1). En el intervalo 0-3hr no se observó crecimiento debido a la liberación lenta del contenido de las cápsulas.

Procedimiento de obtención de un producto bioactivo antimicrobiano

Fermentación del suero de leche por la cepa CECT30089

El suero dulce de cabra proporcionado por la empresa ALCLIPOR, S.A.L. (Benassal, España) se fermenta bacterias de la CECT30089 (a 37 °C) durante 72 horas. Por cada condición se emplearon 2 litros de suero dulce, con un inóculo de 20 ml a una concentración 10⁹UFC/ml del volumen del inóculo.

Para eliminar los posibles microorganismos que puedan afectar al proceso de fermentación, la leche de suero de cabra se pasteuriza a 65°C durante 30 minutos y posteriormente se fermentó en condiciones estériles con el cultivo iniciador previamente activado. La activación se realiza incubando un cultivo iniciador o inóculo en el suero de leche para que la bacteria se activen, este sustrato ha de ser idéntico al de la fermentación posterior. Una vez activado, se hace un escalado 1:100, con una concentración de 10⁹UFC/ml del volumen del inóculo.

Después de la fermentación, las muestras se centrifugan durante 10 minutos a 4000 rpm para eliminar microorganismos y se agrega al sobrenadante 1 mM de inhibidor de la proteasa fluoruro de fenilmetanosulfonilo. Las muestras de suero de leche fermentado se liofilizan y almacenan a -80 ° C para su posterior análisis

Aislamiento y caracterización de los compuestos bioactivos antimicrobianos

La extracción de los compuestos fenólicos se realiza mediante el método descrito por Brosnan et al. (2014) (*The QuEChERS approach in a novel application for the identification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria cultures*. Talanta, 129, 364-373.) con algunas modificaciones. Se extrajeron diez mililitros de suero fermentado utilizando el método QuEChERS. Finalmente, la muestra se suspende en 1 ml de agua: acetonitrilo (90:10 v / v), se filtró a través de un filtro de nylon de 0.22 µm y se almacenan para el análisis cromatográfico. Para la determinación cromatográfica se utilizó un sistema Agilent 1200-LC equipado con un desgasificador de vacío, auto-muestreador y bomba binaria. La separación por cromatografía se realiza utilizando una columna Gemini C18. Los análisis de MS se llevan a cabo utilizando un q-TOF-MS de

precisión de alta definición 6540 Agilent acoplado a la HPLC, equipado con una interfaz de ionización por electropulverización Agilent Dual Jet Stream (Dual AJS ESI) en modo de ionización negativa. Las interpretaciones de los datos se realizan utilizando el software de la estación de trabajo Mass Hunter (Agilent Technologies).

5

Los datos analíticos recopilados evidenciaron que las bacterias de la cepa CECT30089 fueron responsables de la producción moléculas antimicrobianas denominadas globalmente como biocomplejo, el efecto antifúngico observado no se asocia a una molécula en concreto. En el biocomplejo se ha identificado el ácido feniláctico (PLA), un ácido fenólico con elevadas propiedades antimicrobianas, en concentraciones superiores a los 200 mg/L, y otros 19 diferentes compuestos entre ellos, los ácidos ferúlico, cafeico, siríngico, benzoico, gálico etc, todos ellos elementos responsables del efecto antifúngico y antibacteriano. Las concentraciones de los compuestos mencionados en el formulado antimicrobiano fueron variables, entre 10 y 250 mg/L.

15 Aislamiento y caracterización de péptidos bioactivos antimicrobianos

El grado de hidrólisis proteica durante la fermentación realizada por los microorganismos aislados se analiza mediante SDS-PAGE utilizando un gel de separación del 15% (p/v) y un gel de apilamiento del 4%. Para la visualización de las bandas de proteínas, los geles se tiñeron en una solución de tinción: 0.1% de azul brillante R-250, 50% de agua, 40% de metanol y 10% de ácido acético. La masa molecular de las proteínas se evalúa comparándola con los estándares de proteínas BioRad Precision Plus Protein (rango de alto MW) y el polipéptido natural SDS-PAGE (rango de bajo MW) (Luz et al., 2018, *Evaluation of biological and antimicrobial properties of freeze-dried whey fermented by different strains of Lactobacillus plantarum*, Food Funct, 9, 3688–3697).

25 La purificación de péptidos a partir de suero fermentado se lleva a cabo utilizando el método descrito por Saladino et al. (2016) *In vitro antifungal activity of lactic acid bacteria against mycotoxigenic fungi and their application in loaf bread shelf life improvement* con algunas modificaciones. La fracción que contenía péptidos por debajo de 3 kDa se analiza por LC-ESI-MS-TOF. El sistema LC utilizado para la determinación cromatográfica fue un Agilent 1200, equipado con un desgasificador de vacío, inyector automático y bomba binaria. La columna es una bioZen C18 de 50 x 2.1 mm y un tamaño de partículas de 2.6 µm. El análisis de espectrometría de masas se lleva a cabo utilizando un Agilent 6540 Ultra alta definición de cuadrupolo exacto de masa de tiempo de vuelo (Q-TOF), equipado con una interfaz de ionización por electropulverización
30 Agilent Dual Jet Stream (Dual AJS ESI) en modo de ionización positiva MS. El espectro
35

de MS generado se procesa para la secuenciación de péptidos de novo utilizando el software de análisis cualitativo Masshunter B.08.00 (Agilent).

Tabla 3. Péptidos bioactivos antimicrobianos identificados en el suero de leche fermentado por las BALs de la cepa CECT30089.

5

| n° | Proteína | MS observada (Da) | MS esperada (Da) | Delta | Péptido |
|----|-------------------------|-------------------|------------------|-------|------------|
| 1 | α -lactoalbúmina | 618.7119 | 618.3457 | 0.36 | EQLTK |
| 2 | α -lactoalbúmina | 1065.1777 | 1064.5047 | 0.67 | GYGGVSLPEW |
| 3 | α -lactoalbúmina | 570.6892 | 570.2592 | 0.43 | VCTTF |
| 4 | α -lactoalbúmina | 650.7763 | 650.3178 | 0.45 | ALCSEK |
| 5 | α -lactoalbúmina | 957.0154 | 956.3891 | 0.61 | CKDDQNP |
| 6 | β -lactoglobulina | 696.7854 | 696.3352 | 0.45 | VAGTWY |
| 7 | β -lactoglobulina | 976.0777 | 975.4993 | 0.57 | AASDISLLDA |
| 8 | β -lactoglobulina | 674.8664 | 674.4236 | 0.44 | IPAVFK |
| 9 | K-caseína | 1202.4103 | 1201.6800 | 0.73 | YQRRPAIAIN |
| 10 | Lactoferrina (LF) | 1304.5316 | 1303.6913 | 0.84 | GRRRRSVQWC |
| 11 | Lactoferrina (LF) | 1397.6768 | 1396.6725 | 1.00 | KCFQWQRNMR |
| 12 | Lactoferrina (LF) | 1056.3234 | 1055.6030 | 0.72 | KVRGPPVSCI |
| 13 | Lactoferrina (LF) | 1302.5999 | 1301.7372 | 0.86 | WQRRMRKLG |
| 14 | Lactoferrina (LF) | 1231.4740 | 1230.6524 | 0.82 | APRKNVRWCT |
| 15 | Lactoferrina (LF) | 1355.5238 | 1354.5885 | 0.93 | PEWSKCYQWQ |
| 16 | Lactoferrina (LF) | 1172.4498 | 1171.6841 | 0.76 | RRMRKLGAPS |
| 17 | Lactoferrina (LF) | 1007.2070 | 1006.5462 | 0.66 | ITCVRRTSA |
| 18 | Lactoferrina (LF) | 1497.8442 | 1496.7514 | 1.09 | FKCRRWQWRM |
| 19 | Lactoferrina (LF) | 1018.2711 | 1017.5761 | 0.69 | KKLGAPSITC |
| 20 | Lactoferrina (LF) | 1046.2846 | 1045.5823 | 0.70 | RKLGAPSITC |
| 21 | Lactoferrina (LF) | 618.7178 | 618.3682 | 0.34 | VRRTS |
| 22 | Lactoferrina (LF) | 1110.2818 | 1109.5296 | 1.05 | VSQPEATKCF |
| 23 | Lactoferrina (LF) | 1072.2791 | 1071.5615 | 0.71 | GPPVSCIKRD |
| 24 | Lactoferrina (LF) | 1238.4160 | 1237.5670 | 0.84 | PEATKCFQWQ |
| 25 | Lactoferrina (LF) | 960.1995 | 959.5680 | 0.63 | RNMRKVR |
| 26 | Lactoferrina (LF) | 1386.6504 | 1385.6565 | 0.99 | SKCYQWQRMM |
| 27 | Lactoferrina (LF) | 1046.2846 | 1045.5823 | 0.70 | RKLGAPSITC |

El análisis de las proteínas realizado mediante electroforesis SDS-PAGE de los sueros fermentados por las bacterias ácido lácticas (Figura 4) ha evidenciado que las bacterias de la cepa empleada (BN17) tienen una mejor actividad proteolítica en comparación con las muestras tratadas con otras cepas (BN16 y E4) como se observa en la reducción de la intensidad de las bandas que caracterizan el control (a). Como se muestra en el análisis electroforético, las dos proteínas que presentan un grado elevado de hidrólisis son la α -lactoalbúmina, y la β -lactoglobulina, las dos principales proteínas solubles que caracterizan desde el punto de vista proteico el suero de leche.

10

15

Los péptidos purificados (27 diferentes péptidos antimicrobianos, Tabla 3) presentan una composición en aminoácidos variable entre 5 y 10 compuestos con un peso molecular variable entre 570 y 1496Da. Los péptidos identificados se purificaron a gran escala utilizando la metodología de la purificación mediante cromatografía con columna preparativa C18, acoplada a la detección en serie de diodos para la identificación de los

compuestos analizados. La salida del detector está conectada a un colector de fracciones preparativo para la purificación de volúmenes superiores a 50 mL.

Actividad antimicrobiana del suero de leche fermentado por bacterias de la cepa CECT30089

5

Para la evaluación de la actividad del formulado antimicrobiano fermentado por las bacterias lácticas de la cepa CECT30089 se utilizaron las cepas micotoxigénicas de *P. camemberti* CECT 2267, *P. roqueforti* CECT 2905, *P. expansum* CECT 2278, *P. digitatum* CECT 2954, *P. brevicompactum* CECT 2316, y *P. commune* CECT 20767, proporcionadas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Para la valoración cualitativa de la actividad antimicrobiana se empleó el método de Torrijos et al., (2019) (*Development of a Bioactive Sauce Based on Oriental Mustard Flour with Antifungal Properties for Pita Bread Shelf Life Improvement*. *Molecules*, 24, 1019). La determinación de la actividad antimicrobiana de tipo cuantitativo se realizó según el método descrito por Fothergill et al (2012) (*Antifungal Susceptibility 521 Testing: Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) Methods*. In G. Hall (Ed.), *Interactions of Yeasts, Moulds, and Antifungal Agents*. Totowa: Humana Press.) con algunas modificaciones descritas a continuación. Se agregó un volumen de suero de leche fermentado con concentraciones finales que variaron de 0,5 a 250 mg/ml en microplacas estériles de 96 pocillos. Después de eso, los micropocillos se contaminaron con una suspensión de los hongos toxigénicos. El control positivo consistió en medio contaminado con suero de leche de cabra no hidrolizado y el control negativo fue medio no contaminado sin ningún tratamiento. Después del tiempo de incubación, se consideró como concentración inhibitoria mínima (MIC) la concentración de formulado antimicrobiano donde no se observó crecimiento fúngico visible. Después de eso, la concentración de MIC y superior a MIC se cultivaron en placas PDA para la determinación de la concentración mínima de fungicida (MFC). Después de la incubación, el valor de MFC fue la concentración donde no se evidenció un crecimiento fúngico visible.

30

35

Tabla 4. Actividad antimicrobiana del formulado por la cepa de *L. Plantarum* BN17, CECT30089.

| Hongo | Cepa | BN17 | |
|----------------------------------|------------|-------------|-------------|
| | | MIC (mg/ml) | MIF (mg/ml) |
| <i>Penicillium camemberti</i> | CECT 2267 | 12,5 | >100 |
| <i>Penicillium expansum</i> | CECT 2278 | 12,5 | >100 |
| <i>Penicillium brevicopactum</i> | CECT 2316 | 12,5 | >100 |
| <i>Penicillium commune</i> | CECT 20767 | 50 | >100 |

| Hongo | Cepa | BN17 |
|----------------------------------|------------|------|
| <i>Penicillium camemberti</i> | CECT 2267 | ++ |
| <i>Penicillium expansum</i> | CECT 2278 | + |
| <i>Penicillium brevicopactum</i> | CECT 2316 | + |
| <i>Penicillium commune</i> | CECT 20767 | + |

5

Como se evidencia del análisis de los resultados remarcados en la Tabla 4, el formulado antimicrobiano la cepa depositada de *L. plantarum* resultó activa frente a la totalidad de los hongos ensayados, ver Figura 5 y Tabla 4.

Los resultados de la actividad microbiana en medio líquido de las formulaciones antimicrobianas fermentadas por las bacterias ácido lácticas de la cepa depositada evidenciaron dosis inhibitorias mínimas (MIC) y dosis fungicidas mínimas (MFC) variables entre 12,5 y 100 mg/L, confirmando los resultados obtenidos y observados en medio sólido de PDA. Estos últimos resultados son extremadamente interesantes si consideramos que las dosis inhibitorias se encuentran en el rango de los miligramos por litro, concentraciones muy reducidas al tratarse de un biocomplejo de sustancias naturales producidas a través de una fermentación microbiana. Esta presenta unos valores de la MIC muy bajos frente a los hongos más característicos que contaminan el queso y que también se desarrollan en muchos alimentos en fase de conservación como el *P. camemberti*, el *P. expansum*, que es bastante ubicuario en la naturaleza por su capacidad de contaminar diferentes tipologías de productos tanto de origen animal como de origen vegetal, y el *P. brevicompactum*. Considerando los valores de la MIC descritos, y también que la cepa de *L. plantarum* BN17, evidenció una producción alta

20

de moléculas bioactivas antimicrobianas descritas en los párrafos anteriores, se decidió seguir con este microorganismo para la puesta a punto del demostrador, y para su proceso de fabricación y validación.

Definición del producto bioactivo. Materiales y proceso de fabricación.

- 5 Para la obtención de un producto bioactivo, se ha seleccionado como ejemplo el formato de envase demostrador de queso. En función de los envases actuales que se han encontrado en mercado, se considera que el envase ha de estar en contacto directo con el queso para maximizar la efectividad del recubrimiento con el formulado antimicrobiano y de ahí que un objeto de realización preferente de la invención son separadores o films
- 10 de lonchas de queso, para maximizar así el contacto entre el compuesto activo y el queso.

En este ejemplo concreto se empleó un film separador de alimentos comercial sobre el que se aplicó la formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano.

Formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano.

- 15 La etapa a) comprende la fermentación de suero dulce de cabra a 37 °C durante 72 horas, con un inóculo de 10⁹UFC/ml del volumen del inóculo con la cepa CECT30089 previamente activadas. Después de la fermentación, las muestras se centrifugan durante 10 minutos a 4000 rpm para eliminar microorganismos y se liofiliza el fermento antimicrobiano, la liofilización se realiza siguiendo un protocolo habitual y conocido en
- 20 el campo. El formulado antimicrobiano se disolvió en agua a una concentración de entre 15 -20% en peso. La solubilidad del formulado antimicrobiano en agua está directamente relacionado con la naturaleza del sustrato de partida, si el contenido proteico es muy elevado la disolución del fermento antimicrobiano en agua será más difícil y se alcanzarán concentraciones más bajas.

- 25 Para la etapa b) del procedimiento se seleccionó PVOH como matriz polimérica apta para contacto directo con el alimento, que fue disuelta en agua, obteniendo así una concentración de entre un 15% y 20% de matriz polimérica en agua.

- En la etapa c) se adicionó el formulado antimicrobiano disuelto (a) a la matriz polimérica disuelta (b) para preparar la formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano, a una concentración de 20% en peso de formulado antimicrobiano
- 30 sobre el total. La formulación final obtenida se acidifica hasta llegar a un pH de 3 con ácido fosfórico al 4,76% en agua.

Aplicación del recubrimiento

Las formulaciones de recubrimientos obtenidas se aplicaron (etapa d) mediante equipo de aplicación de varillas. Se utilizó la varilla 3, que aplica 24 µm en húmedo de disolución en equipo K control Coater 101 siguiendo un protocolo habitual en el campo de la técnica sobre PET, Papel o film de OPP/EVOH/OPP, para obtener film y separadores activos.

En la Figura 6 se muestra la imagen del producto bioactivo final o film bioactivo obtenido por procedimiento de la invención.

Uso del producto bioactivo

La efectividad del producto obtenido como resultado del procedimiento anterior fue validada en un queso mozzarella en lonchas sin conservantes. En primer lugar, se ensayó la eficacia del film antimicrobiano en placa de Petri con los principales contaminantes del queso y derivados y se demostró su eficacia frente a la mayoría de los hongos ensayados, Tabla 5. Hay que remarcar su gran actividad frente a los dos principales hongos que contaminan el queso como el *P. camemberti* y sobretodo el *P. commune*.

Tabla 5. Actividad antimicrobiana en medio sólidos del film antimicrobiano que contiene la formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano obtenida a partir de *L. Plantarum* CECT30089/BN17.

| Hongo | Cepa | CECT30089/ BN17 |
|----------------------------------|-------------|-----------------|
| <i>Penicillium camemberti</i> | CECT 2267 | ++ |
| <i>Penicillium expansum</i> | CECT 2278 | + |
| <i>Penicillium roqueforti</i> | CECT 2905 | + |
| <i>Penicillium brevicopactum</i> | CECT 2316 | + |
| <i>Penicillium commune</i> | CECT 20767 | ++ |
| <i>Penicillium verrucosum</i> | VTT D 01847 | + |

En segundo lugar, se procedió a la aplicación del dispositivo antimicrobiano para su validación directa en quesos. La formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano de suero de leche fermentado por la bacteria BN17 se usó para cubrir los films de plástico/separadores mediante el proceso descrito en apartados anteriores obteniendo un producto bioactivo para su aplicación directa en el queso en lonchas. El film bioactivo se aplicó a un queso inoculado con 10⁵ esporas/g de las especies fúngicas evidenciadas anteriormente. Como control se utilizó, un queso mozzarella contaminado con las

mismas especies fúngicas y tratado con un film de plástico sin suero. Las muestras se conservaron a temperatura refrigerada de 4°C durante 30 días.

5 Como se muestra en la Figura 7, alcanzado el tiempo de incubación establecido, la muestra control manifiesta un crecimiento de la población fúngica muy extendida, mientras que la muestra tratada con el film antimicrobiano (film bioactivo) no presentaba ningún signo de contaminación fúngica.

10 En la Tabla 6 se evidencian los resultados de vida útil de los quesos inoculados con 10^5 esporas/g de *Penicillium commune* y contaminados de forma natural, y tratados con el film bioactivo en comparación al queso control, tratado con un film de plástico comercial. La inoculación con *P. commune* se hizo siguiendo un protocolo habitual en el campo de la técnica.

15 El empleo del film antimicrobiano presentó un aumento de la vida útil de los quesos inoculados con *Penicillium commune* y contaminados de forma natural en comparación al control de 2 y 4 días, respectivamente. Esto es, un incremento del 14 % y del 21% de la vida útil del queso,

20 Posteriormente se procedió a evaluar el recuento microbiológico de los quesos en ambas condiciones, para ello se realizó una homogenización y diluciones seriadas con agua de peptona al 0.1% con Tween 80 al 0.1%. Finalmente se siembran 100 μ L de estas diluciones en placas con medio de cultivo PCA (*Plate Count Agar*) y se incuban a 26°C durante 48-72 h para el recuento de microorganismos viables. (Quiles, J. M., Manyes, L., Luciano, F., Mañes, J., & Meca, G. (2015). *Influence of the antimicrobial compound allyl isothiocyanate against the Aspergillus parasiticus growth and its aflatoxins production in pizza crust*. Food and Chemical Toxicology, 83, 222-228.). El film bioactivo produjo una reducción del crecimiento de *Penicillium commune* y de la microflora normal del queso en comparación a los controles de 1,1 y 1,8 log UFC/g, respectivamente (Figura 8). Lo que indica que el producto de la invención puede inhibir o retardar el crecimiento fúngico de numerosas especies y no sólo de *P. commune*.

Tabla 6. Estudio de vida útil de quesos a) inoculados con *Penicillium commune* y b) contaminadas de forma natural.

| | | Tiempo de retención crecimiento (días) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----------------------|--|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| a) | Muestras | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Control | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Film bioactivo | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| b) | Muestras | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Control | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Film bioactivo | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Lactobacillus plantarum* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con número 30089 o mutantes derivados de la misma, en donde dichos mutantes tienen las mismas o mejores propiedades antimicrobianas, que la
5 cepa CECT30089.
2. La cepa de la reivindicación anterior, en la que las propiedades antimicrobianas se seleccionan entre propiedades antifúngicas, antibacterianas y combinaciones de ambas.
10
3. Cápsula gastrorresistente para uso como probiótico que comprende la cepa de bacterias definida en una de las reivindicaciones 1 o 2
4. Cápsula gastrorresistente para uso como probiótico según la reivindicación anterior que comprende leche de mamífero, suero de leche de mamíferos, leche vegetal, suero de leche vegetal y combinaciones de los anteriores.
15
5. Cápsula gastrorresistente según la reivindicación anterior, en la que la leche se selecciona entre leche desnatada, semidesnatada, entera y combinaciones de los anteriores.
20
6. Cápsula gastrorresistente para uso como probiótico según una de las reivindicaciones 3 a 5, que comprende al menos un aditivo.
7. Cápsula gastrorresistente según una de las reivindicaciones 3 a 6, en la que la cantidad de bacterias está entre 10^4 y 10^{15} células.
25
8. Formulado antimicrobiano que comprende el producto de la fermentación de un sustrato, por la cepa de la reivindicación 1 o 2 del cual se han separado las bacterias.
30
9. Formulado antimicrobiano según la reivindicación anterior, en el que el sustrato de fermentación se selecciona entre leche de mamífero, suero de leche de mamíferos, leche vegetal, suero de leche vegetal y combinaciones de los anteriores.
35
10. Método para producir un formulado antimicrobiano definido en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, que comprende las siguientes etapas:

- a. fermentar el sustrato con un cultivo iniciador que comprende al menos una cepa de bacterias ácido lácticas definida en la reivindicación 1 o 2 y
- b. al finalizar la fermentación separar las bacterias ácido lácticas del paso a) por centrifugación.

5

11. Método según la reivindicación anterior en el que la concentración inicial del cultivo iniciador es de 10^4 a 10^{12} UFC/ml del sustrato.

10

12. Método de obtención de un producto bioactivo, que comprende las siguientes etapas:

- a. preparación de una disolución del formulado antimicrobiano obtenido según una de las reivindicaciones 10 a 11,
- b. disolución de una matriz polimérica en agua
- c. mezcla del producto de la etapa a) con el producto de la etapa b) para obtener una formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano y
- d. aplicar la formulación obtenida en la etapa c) sobre un material, para obtener un producto bioactivo.

15

20

13. Método según la reivindicación anterior en el que las etapas a) b) y c) tienen lugar simultáneamente.

14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, que comprende ajustar el pH de la formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano a:

25

- a. un intervalo de pH entre 2 y 5, preferiblemente 3, o
- b. el mismo pH del formulado antimicrobiano definido en una de las reivindicaciones 7 ó 8.

30

15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, que comprende la adición de al menos un aditivo a la formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano seleccionados entre:

35

- surfactantes o tensioactivos, por ejemplo, solidos hidrófobos sin siliconas, polisiloxanos y soluciones acuosas de polisiloxanos, polidimetilsiloxano modificado con polieter, aceites a base de parafinas, polisiloxanos en poliglicol, sales de alquilamonio y polimetilalquilsiloxano,

- 5 - aditivos reológicos, soluciones de urea modificada, solución de un poliuretano hidrofóbico modificado, poliuretanos, solución polietilenglicol aminoplástico, derivados del aceite de ricino, soluciones de urea modificada, soluciones de amidas de ácido polihidroxicarboxílico, soluciones de poliuretano con urea, poliamidas de polaridad media modificadas con urea, éster de ácido policarboxílico, y solución de oligoamidas funcionales amina, y
- 10 - ácidos alimentarios como el acético, láctico, málico, fumárico, cítrico, succínico, ascórbico, fórmico, sórbico, tartárico, adípico, nicotínico y fosfórico, preferentemente fosfórico.
- 15 16. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, que comprende aplicar una solución primer promotor de la adhesión sobre el material antes de aplicar la formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano.
- 20 17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en el que el material se selecciona entre plástico, preferentemente PE (polietileno), polipropileno (OPP), tereftalato de polietileno (PET), polietileno de baja densidad (LDPE), polietileno de alta densidad (HDPE), Etilen-Vinil-Alcohol (EVOH), papel y etilvinilacetato (EVA), almidón de maíz, polipropileno (PP), polipropileno modificado mediante polimerización fotoiniciada de ácido acrílico (PP-g-PAA), ácido poliláctico (PLA), policloruro de vinilo (PVC), quitosano, gelatina de pescado, celulosa, papel y combinaciones de estos.
- 25 18. Formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano que comprende el formulado antimicrobiano definido en una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9 y una matriz polimérica disuelta en agua.
- 30 19. Formulación de recubrimiento de suero antimicrobiano, según la reivindicación anterior, en la que la matriz polimérica se selecciona entre: alcohol de polivinilo (PVOH), copolímeros de Etilen-Vinil-Alcohol (EVOH), copolímeros acrílico-estireno, resinas acrílicas, dispersiones acuosas aniónicas, dispersiones acuosas, resinas de poliuretano alifático, copolímeros acrílico-uretano, poliuretanos, resinas alquídicas, PVC, acetato de polivinilo, nitrocelulosa, butirato de polivinilo (PVB), poliéster (PET), acrilatos de poliéster, uretanos, quitosano, alginatos,
- 35

hidroxipropilmetil celulosa, (HPMC), almidón, soluciones de polientilenglicol aminoplásticos, polisacáridos, ácidos grasos, proteínas, ceras, gomas, colágeno, pectinas, gelatinas y composites.

- 5 20. Producto bioactivo obtenido por el método definido en una de las reivindicaciones 12 a 17 que comprende la formulación de una de las reivindicaciones 18 a 19 y un material.
- 10 21. Producto bioactivo según la reivindicación anterior, que presenta la forma de una lámina, un film y/o un envase, preferentemente un film.
22. Uso del producto bioactivo definido en cualquiera de las reivindicaciones 20 a 21 como inhibidor del crecimiento microbiano en productos alimenticios.
- 15 23. Uso del producto bioactivo según la reivindicación anterior como inhibidor del crecimiento fúngico en productos alimenticios.
24. Uso según una de las reivindicaciones 22 o 23, en el que los productos alimenticios son productos lácteos, preferiblemente queso.
- 20 25. Uso de la cepa de *Lactobacillus plantarum* definida en la reivindicación 1, como inhibidor del crecimiento antimicrobiano en productos alimenticios.
- 25 26. Uso de la cepa de *Lactobacillus plantarum* definida en la reivindicación 1 o 2, como probiótico.

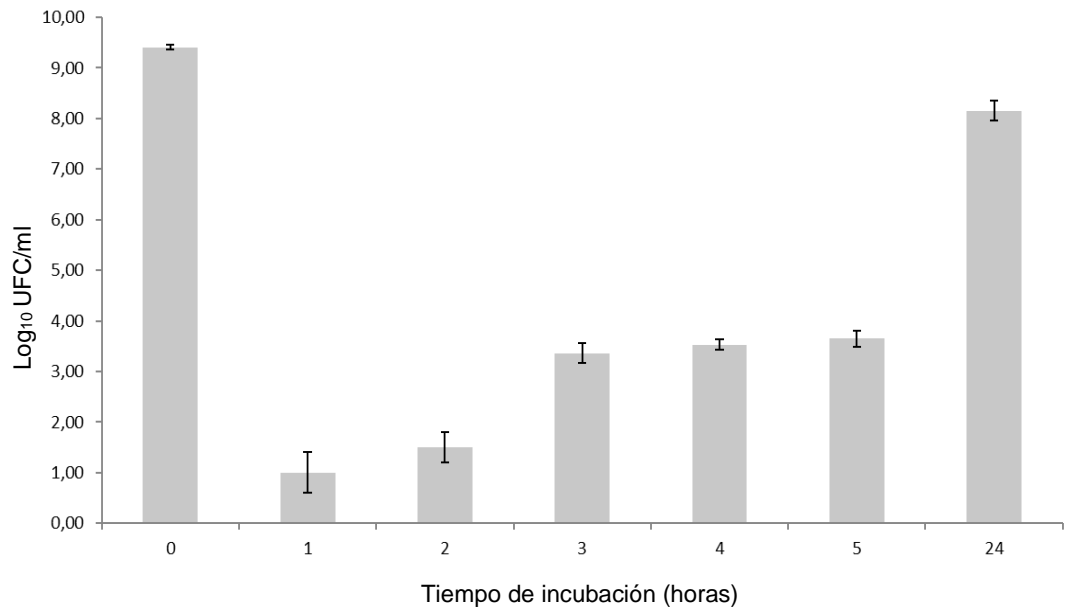


Fig. 1

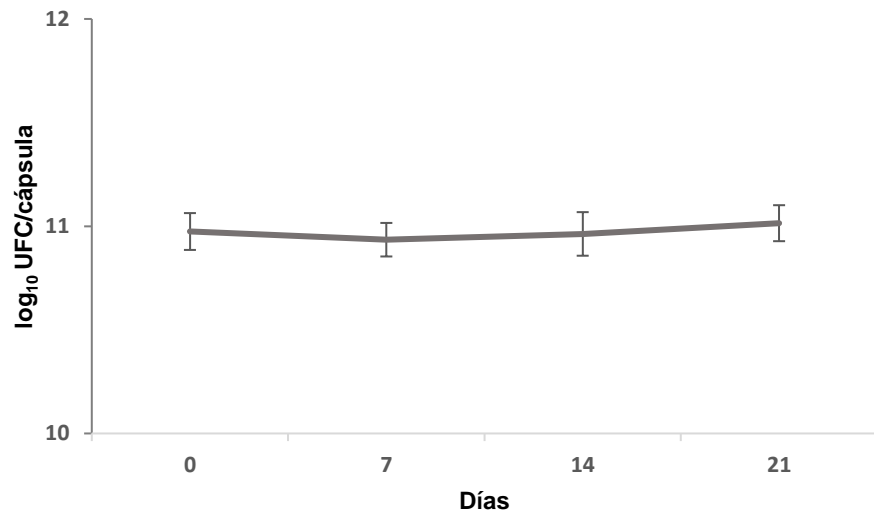


Fig. 2

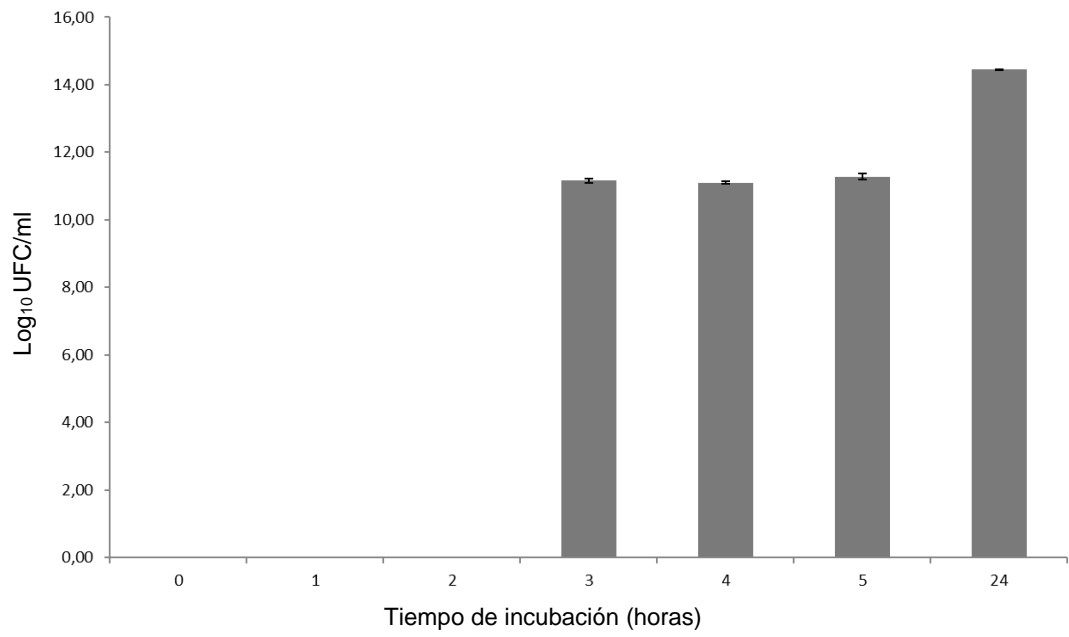


Fig. 3

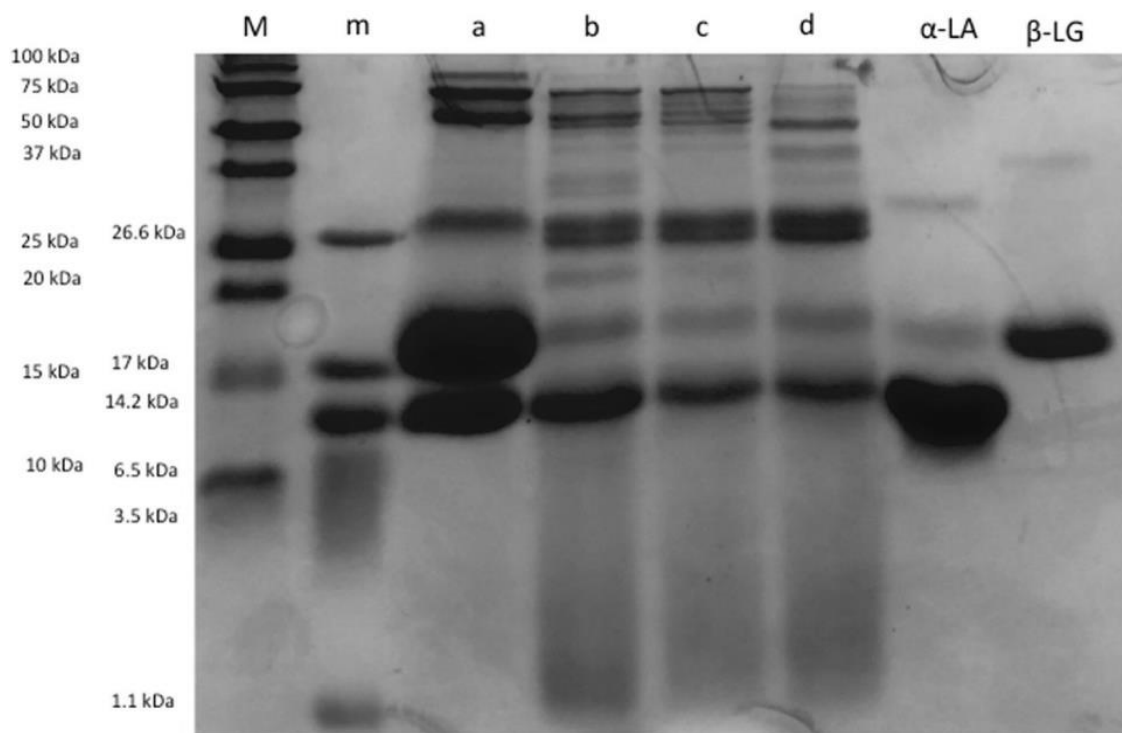


Fig. 4



Fig. 5

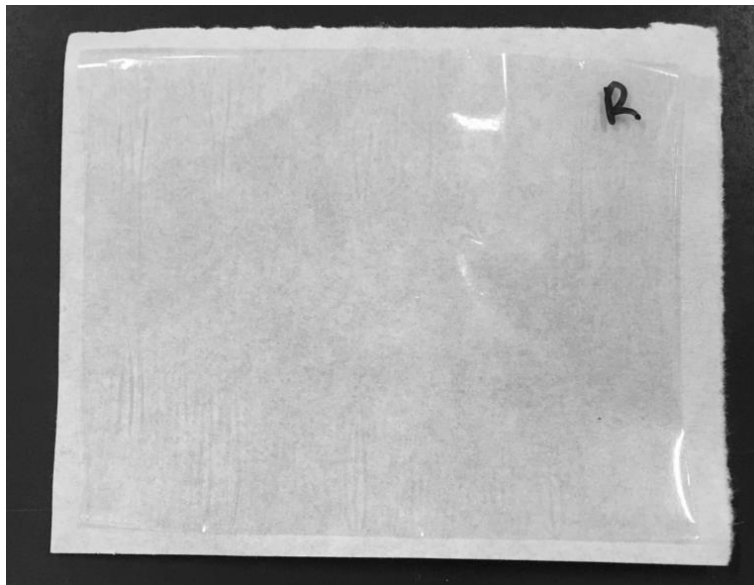


Fig. 6

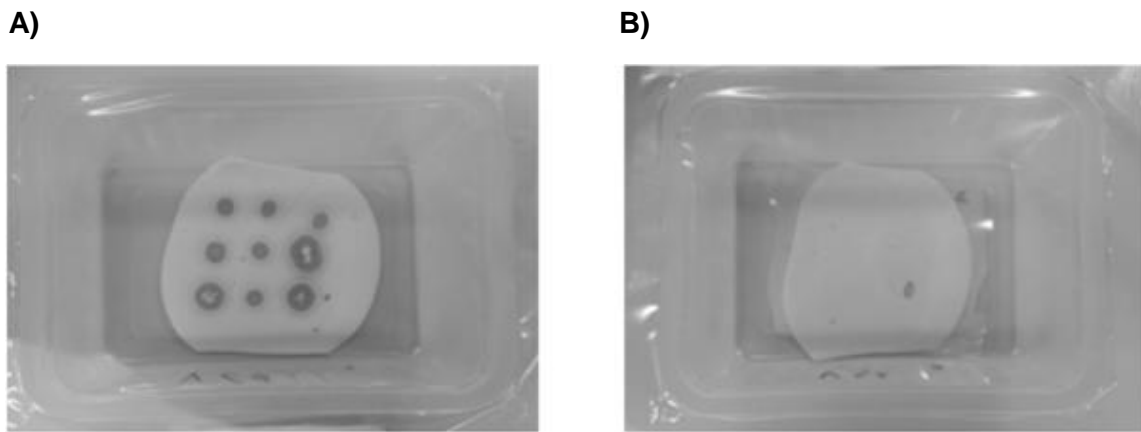
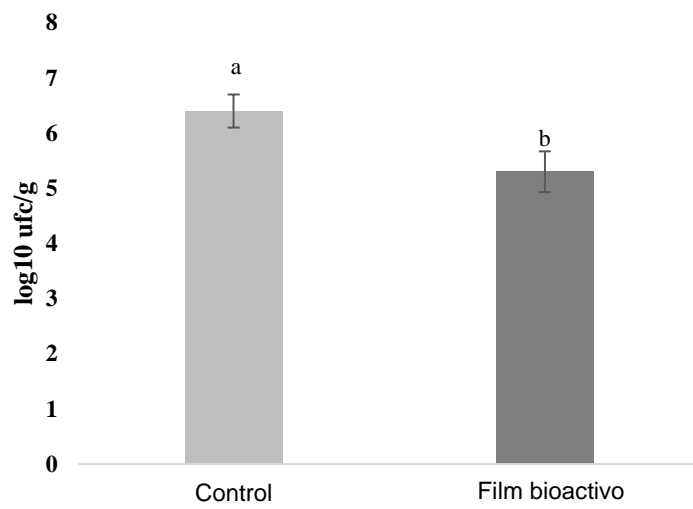


Fig. 7

a)



b)

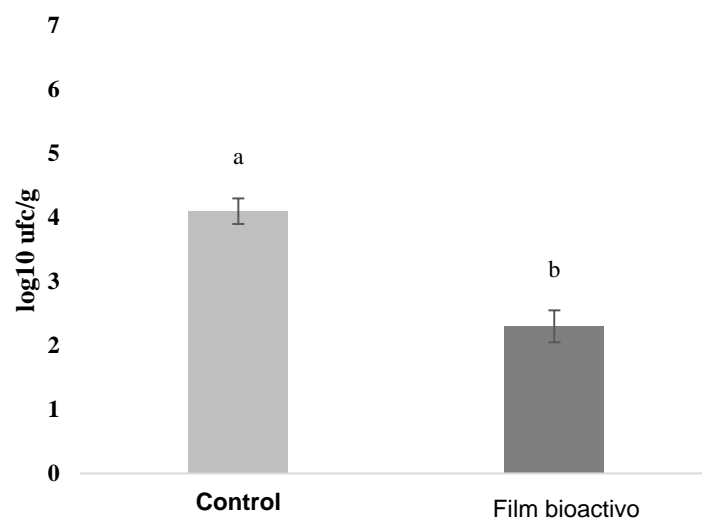


Fig. 8