



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 303 379**

51 Int. Cl.:
C07K 14/315 (2006.01)
A23L 3/3463 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
A23C 9/158 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99928187 .6**
86 Fecha de presentación : **22.06.1999**
87 Número de publicación de la solicitud: **1090035**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **11.04.2001**

54 Título: **Polvo de bacteriocina secado por atomización con actividad antibiótica.**

30 Prioridad: **22.06.1998 IE 980500**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2008

73 Titular/es: **TEAGASC, THE AGRICULTURE AND
FOOD DEVELOPMENT AUTHORITY
19 Sandymount Avenue
Dublin 4, IE
University College Cork-National University of
Ireland, Cork**

72 Inventor/es: **Ross, Reynolds, Paul y
Hill, Colin**

74 Agente: **Trullols Durán, María del Carmen**

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

Polvo de bacteriocina secado por atomización con actividad antibiótica.

La presente invención se refiere a un método para obtener un polvo de bacteriocina secado por atomización con actividad antibiótica.

Técnica anterior

La eliminación de las sustancias que deterioran los alimentos y de los organismos patógenos ha sido objetivo de numerosas investigaciones, ya que las enfermedades derivadas del consumo de alimentos tienen un gran impacto en términos de individuos afectados y coste del tratamiento. Se ha estimado que los agentes patógenos microbianos presentes en los alimentos causan anualmente entre 6,5 y 33 millones de casos de enfermedades humanas en los EE.UU., con un coste de entre 2,9 y 6,7 miles de millones de dólares (2), siendo los agentes patógenos tipo grampositivo transmitidos por los alimentos responsables de entre un 25 y un 55% de los costes. En los últimos años, la demanda por parte del consumidor de alimentos frescos seguros mínimamente procesados, además de la preocupación por el uso de conservantes químicos en los alimentos, ha creado un interés notable en la aplicación de bioconservantes. Las bacteriocinas producidas por bacterias del ácido láctico se consideran alternativas a los conservantes tradicionales para asegurar la seguridad de los alimentos y se han identificado con facilidad aplicaciones potenciales en los alimentos (21).

La nisina, una bacteriocina producida por ciertas cepas de *Lactococcus lactis*, se ha utilizado de manera satisfactoria para controlar el deterioro de alimentos, en varios alimentos diferentes, véase por ejemplo la patente DE 2616390 y el estudio de la fabricación de leche deshidratada con alto contenido en nisina (base de datos FSTA [en línea] acceso a la base de datos no. 75-2-06-p1345), que incluye quesos, productos enlatados y postres lácteos (10). Sin embargo, su empleo está sujeto a ciertas restricciones. Es más eficaz en alimentos con pH ácido (pH inferior a 6,0) y bajo contenido en proteínas y en grasas. Es poco soluble para valores de pH superiores a 6,0 y por ello para muchos alimentos su eficacia es limitada. Se ha desarrollado una forma en polvo de nisina, Nisaplin (Aplin y Barrett, Towbridge, Wiltshire, Reino Unido), y se utiliza para la conservación de alimentos.

Además del desarrollo de Nisaplin, se han desarrollado otros agentes que contienen bacteriocina en polvo, para la conservación de alimentos. *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermani* se utiliza para obtener Microgard (Wesman Foods, Inc., Beaverton, Oregón, EE.UU.) por pasteurización y secado de la leche desnatada fermentada por bacterias propiónicas. Se estima que se utiliza en aproximadamente un tercio de todos los quesos cremosos cuajados fabricados en los EE.UU. y supuestamente inhibe la mayor parte de las bacterias gramnegativas y algunos hongos (4). Los agentes activos presentes en Microgard incluyen ácido propiónico, ácido acético, diacetilo, ácido láctico y un péptido termoestable de aproximadamente 700 daltonios que se considera el componente más activo.

La lacticina 3147 es una bacteriocina producida por *L. lactis* DPC3147 que tiene una capacidad anfitriona similar a la de la nisina, en la medida en que inhibe una gran cantidad de organismos grampositivos, como *Listeria*, *Clostridium* spp., *Enterococcus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* (17). Dado que muchos de estos organismos se han identificado como agentes de descomposición y agentes patógenos de los alimentos, el desarrollo de un sistema basado en la lacticina 3147 para el control de estos organismos presenta atractivos obvios. Esto puede obtenerse de dos maneras. La primera conlleva el uso de cultivos iniciadores (que comprenden transconjugantes) que producen lacticina 3147, y pueden utilizarse en fermentaciones de alimentos en los que estas cepas pueden sustituirse por los cultivos iniciadores originales. Los determinantes genéticos para la lacticina 3147 se codifican en un plásmido de 60,2 kb, el pMRC01, que se ha secuenciado completamente (6) y que se ha transferido a diversos cultivos iniciadores de queso (3). La lacticina 3147 es el objeto de la solicitud PCT No. PCT/IE96/00022, publicada como WO 96/32482.

Recientemente, se ha comprobado que una lacticina 3147 que produce transconjugantes puede inhibir la *Listeria monocitogenes* en quesos cremosos cuajados. Este iniciador puede utilizarse también para controlar la proliferación de bacterias del ácido láctico no iniciadoras en queso Cheddar. La segunda vía para mejorar la seguridad de los alimentos mediante el uso de la lacticina 3147 conlleva el desarrollo de la bacteriocina en una forma secada por atomización. La ventaja de dicho polvo bioactivo es que podría aplicarse como un ingrediente para alimentos en diversos alimentos. Sin embargo, no es obvio en absoluto que la bacteriocina sea lo suficientemente consistente como para resistir el secado por atomización y existe la posibilidad de que el secado por atomización resulte en una pérdida importante de actividad de la bacteriocina.

Objetivo de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar un proceso para fabricar un ingrediente para alimentos enriquecido con lacticina 3127 para la incorporación en productos alimentarios. En particular, se pretende proporcionar un polvo de lacticina 3127 secada por atomización. No podía predecirse que pudiera obtenerse dicho polvo secado por atomización, ya que el secado por atomización podría haber causado la desnaturalización de la bacteriocina debido al calor, teniendo en cuenta que la lacticina 3147 está compuesta por dos péptidos, ambos necesarios para su actividad. Además, la deshidratación podría inactivar la bacteriocina de manera irreversible.

En la presente invención se describe un polvo bioactivo basado en el lactosuero, con eficacia en el control de dos patógenos representativos, *L. monocitogenes* y *Staphylococcus aureus*, en disolución amortiguadora del pH, tanto a

pH neutro como ácido. También se describe su eficacia en el control de *L. monocytogenes* en una formulación de leche para lactantes y otros productos alimentarios. Sin embargo, resultará evidente para los expertos en la materia que el polvo de bacteriocina descrito no necesita ser un derivado lácteo y que sería posible también obtener una bacteriocina secada por atomización a partir, por ejemplo, de otros polvos, materiales sintéticos o similares.

Resumen de la invención

Según la presente invención se ofrece un proceso para la producción de lacticina 3147 secada por atomización que comprende:

- (a) la inoculación de un medio con una cepa de bacterias productora de lacticina 3147;
- (b) la fermentación del medio inoculado;
- (c) el ajuste del pH de la fermentación entre 6,3 y 6,7.
- (d) la inactivación del fermento bacteriano;
- (e) la evaporación del fermento de la etapa (d);
- (f) el secado por atomización del polvo obtenido en la etapa (e).

El medio que puede inocularse con las bacterias puede seleccionarse de entre polvos de leche o de productos lácteos que comprenden polvo de lactosuero desmineralizado, polvo de leche desnatada reconstituida, polvo concentrado de proteína de lactosuero, leche pasteurizada, lactosuero de queso Cheddar o medios sintéticos de laboratorio tales como caldo de LM17 o de TY o semejantes.

Preferentemente el medio inoculado se fermenta a unos 30°C durante aproximadamente de 6 a 24 horas.

Preferentemente el pH de la fermentación se ajusta a aproximadamente 6,5.

El fermento bacteriano se inactiva, convenientemente, mediante pasteurización o mediante tratamiento a temperaturas muy elevadas.

Si el fermento se pasteuriza, la pasteurización se realiza convenientemente, a aproximadamente 72°C durante aproximadamente 15 segundos.

Preferentemente el fermento inactivado se evapora a aproximadamente 6°C hasta aproximadamente el 40% de los sólidos totales.

El concentrado de la etapa (e) puede enfriarse a aproximadamente 32°C, sembrarse con lactosa a aproximadamente 0,1% en peso y cristalizarse a una velocidad de enfriamiento de aproximadamente 1°C por hora.

El concentrado cristalizado se seca por atomización mediante métodos conocidos en la técnica de acuerdo con la etapa (f).

Se describe un polvo de lacticina 3147 secado por atomización que tiene la capacidad de inhibir organismos que no son resistentes a la lacticina 3147 y que puede tener, convenientemente, una actividad de aproximadamente 40240 ua (unidades arbitrarias)/por mL.

También se describe un producto alimentario que comprende un polvo de lacticina 3147 secada por atomización. El producto alimentario puede ser una formulación de leche para lactantes, una salsa, una mayonesa, un postre, un yogur, una crema, un producto alimentario enlatado, como por ejemplo una verdura enlatada o un producto cárnico enlatado, una sopa, un producto de repostería o productos similares.

El producto alimentario puede haber sido sometido además a un aumento de presión hidrostática durante el proceso de fabricación, convenientemente a una presión de aproximadamente 150 a 800 MPa.

Leyendas de las figuras

La presente invención se describe a continuación de forma más detallada con respecto a los dibujos que la acompañan donde:

Figura 1. (A) Crecimiento de *L. lactis* DPC3147 y obtención de lacticina 3147 en suero desmineralizado reconstituido al 10% a 30°C, con control y sin control de pH. (◆) ufc/mL sin imponer control de pH, (■) ufc/mL a pH constante de 6,0, (●) ufc/mL a pH constante de 6,5 y (○) ufc/mL a pH constante de 7,0. (■) UA/mL sin control de pH, (□) UA/mL a pH constante de 6,0, (■) UA/mL a pH constante de 6,5 y (■) UA/mL a pH constante de 7,0. (B) Actividad inhibitoria de la lacticina 3147 frente a *L. lactis* HP cuando (a) su crecimiento tiene lugar sin control del pH y cuando (b) su crecimiento tiene lugar a pH constante de 6,5.

ES 2 303 379 T3

Figura 2. Diagrama esquemático del perfil de temperatura y de la actividad de la lacticina 3147 durante la fabricación de polvo de lacticina 3147.

Figura 3. Efecto del polvo de lacticina 3147 en la viabilidad de *Listeria monocytogenes* Scott A en disolución reguladora de pH a 30°C (A) a un pH de 5 y (B) a un pH de 7. (♦) sin adición, (■) adición de polvo de lacticina 3147 al 10%.

Figura 4. Efecto del polvo de lacticina 3147 en la viabilidad de *Staphylococcus aureus* 10 en disolución reguladora de pH a 30°C (A) a pH 5 y (B) a pH 7. (♦) sin adición, (■) adición de polvo de lacticina al 15%.

Figura 5. Efecto del polvo de lacticina 3147 en la viabilidad de *L. monocytogenes* Scott A cuando se utiliza como componente de la formulación de la leche para lactantes, (■) polvo de lacticina al 15%, (▲) de polvo de lacticina al 10%, polvo de leche para lactantes al 5%. (●) polvo de lacticina al 5%, polvo de leche para lactantes al 10%, (♦) polvo de leche para lactantes al 15%.

Figura 6. Efecto del polvo de lacticina 3147 (10%) en la viabilidad de *Listeria monocytogenes* Scott A en yogur, (♦) sin adición de lacticina 3147, (■) adición de 10% de lacticina 3147. El 10% se refiere aquí a 10 g de polvo de lacticina 3147 añadidos a 90 g de yogur.

Figura 7. Efecto del polvo de lacticina 3147 (10%) en la viabilidad de *Listeria monocytogenes* Scott A en el queso cremoso cuajado, (♦) sin añadir lacticina 3147, (■) añadiendo lacticina 3147 al 10%. El 10% se refiere aquí a 10 g de polvo de lacticina 3147 añadidos a 90g de queso cremoso cuajado (tipo *cottage*).

Figura 8. Efecto del polvo de lacticina 3147 (10%) en la viabilidad de *Bacillus cereus* en sopa (de sobre).

(♦) sin añadir lacticina 3147,

(■) añadiendo 1% de lacticina 3147,

(▲) añadiendo 5% de lacticina 3147,

(●) añadiendo 10% de lacticina 3147.

El 1, 5, 10% se refiere aquí a 1, 5 ó 10 g de lacticina 3147 añadidos a 99, 95 ó 90 g de polvo de sopa en sobre, reconstituídos después conforme a las instrucciones del fabricante.

Figura 9. Efecto del polvo de lacticina 3147 (10%) en la viabilidad de *Listeria monocytogenes* Scott A en sopa (de sobre).

(♦) sin añadir lacticina 3147,

(■) añadiendo 1% de lacticina 3147,

(▲) añadiendo 5% de lacticina 3147,

(●) añadiendo 10% de lacticina 3147.

El 1, 5, 10% se refiere aquí a 1, 5 ó 10 g de lacticina 3147 añadidos a 99, 95 ó 90 g de polvo de sopa en sobre, reconstituídos después conforme a las instrucciones del fabricante.

Figura 10. Efecto del aumento de la presión en la actividad de lacticina 3147, (a) presión atmosférica, (b) 200 MPa, (c) 400 MPa, (d) 600 MPa y (e) 800 MPa.

Figura 11. Efecto del aumento de la presión y de la lacticina 3147 en la viabilidad de *L. innocua* DPC 1770.

Ejemplo

Materiales y métodos

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

El productor de bacteriocina *L. lactis* ssp. *lactis* DPC3147 y la cepa indicadora sensible *L. lactis* subsp. *lactis* HP se cultivaron de la manera habitual a 30°C en M17 (20: Oxoid Ltd. Basingstoke. Hampshire. Inglaterra) enriquecidas con un 0,5% (peso/volumen) de lactosa. Otras cepas indicadoras utilizadas incluían *L. monocitogenes* Scott A cultivada en Trypticase Soy Broth (TSB. Becton Dickinson and Co. Cockeysville, MD21030, EE.UU.) enriquecidas con un 0,6% (peso/volumen) de extracto de levadura (Oxoid), y *Staphylococcus aureus* 10 (colección de cultivo DPC. Moorepark, Fermoy, Co. Cork, Irlanda) cultivada en caldo de Brain Heart Infusion (BHI. Oxoid), ambos a 37°C. Los medios sólidos se prepararon mediante la adición de un agar bacteriológico al 1% (Oxoid).

ES 2 303 379 T3

Para la fabricación de lacticina 3147 se investigaron diversos medios diferentes. Éstos se prepararon como disoluciones al 10% (peso/volumen), aparte de leche entera pasteurizada y de lactosuero de queso Cheddar. Las disoluciones al 10% se prepararon a partir de polvo de lactosuero desmineralizado (95% desmineralizado), polvo de leche desnatada reconstituida (Dairygold, Mitchelstown, Co. Cork, Irlanda) y polvo concentrado de proteína de lactosuero (WPC35, 35% de proteínas en materia seca. Moorepark Technology Ltd. Moorepark, Fermoy, Co. Cork, Irlanda). Las disoluciones derivadas del lactosuero se esterizaron por calentamiento a 95°C durante 30 minutos. La disolución en polvo de leche desnatada se esterilizó al autoclave a 121°C durante 5 minutos.

Análisis de la bacteriocina y determinación de la actividad

La actividad de la bacteriocina se determinó mediante la técnica de difusión en pocillos de agar descrito por Parente y Hill (15). Se hizo una siembra de una cepa de indicador en agar fundido y distribuido en placas de Petri. Se realizaron pocillos de aproximadamente 4,6 mm de diámetro en el agar y se distribuyó en cada pocillo un volumen de 50 μ m de la disolución resultante de llevar a cabo diluciones 1:2 sucesivas de una preparación de bacteriocina. La disolución de bacteriocina se preparó centrifugando el cultivo y tratando térmicamente el sobrenadante a 70°C durante 10 minutos, antes de llevar a cabo las diluciones sucesivas. Las placas se incubaron a 30°C o a 37°C dependiendo de la cepa indicadora utilizada. La actividad de la bacteriocina se calculó como el inverso del cociente de la última dilución que dio una zona clara definida tras la incubación durante la noche. Las unidades de actividad (UA) se expresaron por milímetro (L/dilución x 20).

Fermentaciones con control de pH

Se llevaron a cabo fermentaciones con los pH controlados durante un periodo de 24 horas, con agitación lenta (aproximadamente 20 rpm) a 30°C. Se utilizó un inóculo al 1% de DPC3147 para inocular 100 mL de medio de cultivo. El pH del medio de cultivo se mantuvo constante mediante la adición de NaOH 1,0 M según lo necesario mediante un 71S STAT[®] Titrino (Metrohm, Irlanda). Los recuentos de células y las estimaciones de actividad de la bacteriocina se llevaron a cabo a intervalos horarios durante las 10 primeras horas, y se tomó una muestra final al cabo de 24 horas.

Obtención de un polvo de lacticina 3147 secado por atomización

Se inoculó un volumen de 170 L de polvo de suero desmineralizado (10% de los sólidos totales) con un 1% de DPC3147 y se controló el pH de la fermentación de 24 horas mediante la adición de NaOH 2,5 M según lo necesario (pH 6,5). El fermento se pasteurizó entonces a 72°C durante 15 segundos utilizando un pasteurizador APV SSP (APV, Silkeborg, Dinamarca). El fermento pasteurizado se evaporó entonces a 60°C hasta un 40% de los sólidos totales utilizando un evaporador de película descendente de simple efecto (Anhydro model F1 Lab). El concentrado resultante se enfrió a 32°C, se sembró con lactosa (0,1% peso húmedo) y se dejó precristalizar durante la noche a una velocidad de enfriamiento de 1°C por hora. El concentrado precristalizado se secó después por atomización utilizando atomización por boquilla en un secador por atomización Anhydro (modelo Anhydro Lab 3) a una temperatura de entrada del aire de 190°C y una temperatura de salida del aire de 90°C. Se tomaron alícuotas del polvo, se envasaron en bolsas de muestra revestidas interiormente con papel de aluminio y se almacenaron a 4°C. La actividad de la bacteriocina se evaluó en cada paso durante el proceso.

Efecto del polvo de lacticina 3147 frente a patógenos en disolución reguladora de pH

Se cultivaron células sensibles hasta una fase exponencial media, se lavaron y se resuspendieron a aproximadamente 10^7 - 10^8 ufc/mL en 2,5 mM de disolución reguladora de pH de fosfato de sodio a pH 7,0 o pH 5,0 y 2,5 mM de disolución reguladora de pH de fosfato de sodio a pH 7,0 o pH 5,0 enriquecida con 10 mM de glucosa. Se añadió polvo de lacticina 3147 (en diferentes concentraciones dependiendo de la cepa sensible investigada) y se tomaron muestras a intervalos de tiempo apropiados durante un periodo de 3 horas para determinar el recuento de células viables.

Efecto del polvo de lacticina 3147 frente a L. monocytogenes en una formulación de leche para lactantes

Se añadió polvo de lacticina 3147 a una formulación de leche para lactantes disponible comercialmente, [ingredientes detallados en la siguiente lista: polvo de lactosuero desmineralizado, aceites vegetales, lactosa, leche desnatada, carbonato de calcio, citrato de potasio, cloruro de calcio, citrato de sodio, cloruro de magnesio, vitamina C, emulsionante (lecitina de soja), taurina, hidróxido de potasio, sulfato de hierro, sulfato de cinc, vitamina E, nicotinamida, ácido pantoténico, vitamina A, sulfato de cobre, ácido cítrico, tiamina, vitamina B₆, (caroteno, sulfato de manganeso, yoduro potásico, ácido fólico, vitamina K, selenito de sodio, vitamina D, biotina). Las instrucciones de los fabricantes indican que el líquido final para el consumo para lactantes es una disolución final al 15% (peso/volumen). En los experimentos, el 15% (peso/volumen) del polvo de leche para lactantes se reemplazó con 5% (peso/volumen) de polvo de lacticina y 10% (peso/volumen) de polvo de leche para lactantes, o con 10% (peso/volumen) de polvo de lacticina y 5% (peso/volumen) de polvo de leche para lactantes. Se cultivaron células de *L. monocytogenes* hasta la fase exponencial media, se lavaron y se resuspendieron a aproximadamente 10^4 ufc/mL en las diferentes formulaciones de leche para lactantes a 30°C y se tomaron muestras a intervalos de tiempo apropiados durante un periodo de 3 horas para determinar el recuento de células viables.

ES 2 303 379 T3

Preparación de lacticina 3147 para el uso en estudios de inactivación a presión alta

Se elaboró una preparación de lacticina 3147 para la inactivación de *S. aureus* ATCC6538 utilizando cromatografía de adsorción hidrófoba. Se fabricó una preparación en polvo de grado alimentario de lacticina 3147 para estudiar la inactivación de *L. innocua* DPC 1770 de la manera descrita anteriormente con la siguiente modificación: se fermentó una disolución en polvo de suero desmineralizado al 1% con *L. lactis* subsp. *lactis* DPC3127 en condiciones de control de pH a pH 6,0 durante 18 horas.

Se determinó la actividad de ambas preparaciones de lacticina 3147 mediante la técnica de difusión en pocillos de agar tal y como describen Parente y Hill (15). Se sembró en agar fundido la cepa indicadora *L. lactis* subsp. *lactis* HP y se distribuyó en placas de Petri. En el agar se realizaron pocillos de aproximadamente 6,00 mm de diámetro y se distribuyó en cada pocillo un volumen de 50 μ m de una disolución resultante de llevar a cabo diluciones 1:2 sucesivas de una preparación de bacteriocina. Las placas se incubaron después a 30°C. La actividad de la bacteriocina se calculó como la inversa de la última dilución que dio una zona clara definida tras incubación de un día para otro. Las unidades de actividad (UA) se expresaron por milímetro (1/dilución, x 20). La actividad también puede ser expresada como diámetro de zona (mm), donde se toma como diámetro el de la primera zona (muestra clara, sin diluir) de la serie de dilución.

Efecto de la presión alta en la viabilidad de *S. aureus* ATCC6538 y *L. innocua* DPC1770

Las células de *S. aureus* ATCC6538 se resuspendieron en 10% de leche desnatada reconstituida y se llevaron alícuotas de las mismas a pipetas Eppendorf estériles para PCR de 700 μ L antes de ponerlos en bolsas del homogeneizador Stomacher (Seward Ltd., London, Reino Unido). Se resuspendieron unos volúmenes de 10 mL de células de *L. innocua* DPC1770 en polvo de lactosuero desmineralizado reconstituido al 20% en bolsas Stomacher esterilizadas. Las muestras se sellaron al vacío de manera individual antes de ser situadas en el recipiente a presión (Stansted Fluid Power Ltd., Stansted, Inglaterra). El recipiente consistía en un cilindro de acero inoxidable (37 mm de diámetro x 300 mm de altura) que contenía un 15% en volumen de aceite de ricino en disolución de etanol como medio de presurización hidrostática. Las muestras se trataron a 25°C durante 30 min en el intervalo de presión de 150 a 600 MPa, además de realizarse un control de muestra a presión atmosférica (0,1 MPa). Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado. La temperatura de la cámara se determinó mediante un sistema termorregulador que circulaba para mantener la temperatura de la cámara.

Efecto de la presión alta en la actividad de la lacticina 3147

Para determinar el efecto del aumento de presión en la actividad de lacticina 3147, se selló al vacío polvo de lacticina 3147 reconstituida y alícuotas de lacticina 3147 en forma líquida y se expusieron a presiones comprendidas entre 100 y 800 MPa tal como se ha descrito anteriormente. Las disoluciones presurizadas y no presurizadas de lacticina 3147 fueron tratadas térmicamente a 80°C durante 10 minutos de manera previa a la determinación de la actividad mediante el método de difusión en perforaciones utilizando *L. lactis* HP como cepa indicadora.

Resultados

El objetivo de esta investigación era desarrollar un método para producir una forma en polvo de lacticina 3147 apta para ser utilizada como ingrediente de ayuda en el control de microorganismos no deseados en los alimentos. Se llevó a cabo una fermentación a escala tras la optimización de producción de lacticina 3147 y el fermentado se secó por atomización para formar un polvo rico en bacteriocina. Este polvo se sometió, en una disolución reguladora de pH y en un sistema alimentario de leche para lactantes, a una prueba para determinar su capacidad para inhibir organismos patógenos.

Producción de lacticina 3147 en varios medios

Tras la inoculación de DPC3147 (1%) y la incubación durante la noche a 30°C, se analizó la actividad de la lacticina 3147 en una variedad de diferentes medios de cultivo. La mayor parte de los medios eran derivados lácteos, pero se incluyeron también dos medios sintéticos (LM 17 y TY). Los resultados de la producción de lacticina 3147 (véase la tabla 1) demostraron que la actividad era alta en casi todos los medios derivados de productos lácteos (1280 a 2560 UA/mL) aparte del WPC35 (320 UA/mL). Los niveles más altos de actividad de lacticina 3147 se hallaron en el lactosuero del queso Cheddar, en la leche entera y en el LM17 (2560 UA/mL). Tanto el polvo de lactosuero desmineralizado reconstituido al 10% como el polvo de leche desnatada reconstituida al 10% dieron una actividad de 1280 UA/mL. Se observaron niveles menores de actividad de lacticina 3147 en el caldo de TY (640 UA/mL).

Puesto que el polvo de lactosuero desmineralizado está disponible comercialmente y se puede adquirir con facilidad y se observó una buena actividad de lacticina 3147 en este medio, se llevaron a cabo más investigaciones encaminadas a la optimización de la obtención de lacticina 3147 en polvo de suero desmineralizado.

Optimización de la obtención de lacticina 3147 en la producción de polvo de lactosuero desmineralizado reconstituido al 10%

La producción de bacteriocina y los recuentos de células viables en fermentaciones con control de pH y sin control de pH indicaron que los aumentos de niveles de lacticina 3147 podían obtenerse manteniendo el pH de los medios de cultivo a un valor constante de 6,5 (Figura 1). Los niveles de actividad de la bacteriocina alcanzaron 10240 UA/mL en polvo de suero desmineralizado reconstituido al 10% cuando el pH de los medios de cultivo se mantuvo constante a un valor de 6,5 (Figura 1B (a)) comparado con 640 UA/mL cuando no se impuso control del pH (Figura 1B (b)). Tanto a pH 6,0 como a pH 7,0 la actividad de la lacticina alcanzó 5120 UA/mL. Los resultados de los recuentos de células viables durante un periodo de 24 horas indicaron que el aumento de actividad de la bacteriocina correspondía a unas densidades celulares mayores. Sin control de pH los recuentos de células alcanzaron 1×10^9 ufc/mL, mientras que cuando el pH de los medios de crecimiento se mantuvo a pH constante de 6,5 los recuentos de células viables alcanzaron $3,8 \times 10^9$ ufc/mL (Figura 1A). Con control de pH a 6,0 y 7,0 los recuentos de células viables alcanzaron $2,5 \times 10^9$ ufc/mL.

Producción de polvo de lacticina 3147

Se fabricó un preparado de lacticina 3147 secado por atomización según la manera descrita en el apartado materiales y métodos. Durante el proceso de fabricación se evaluó la actividad de la bacteriocina en cada paso, utilizando *L. lactis* HP como cepa indicadora (Figura 2). Tras la fermentación con control de pH (en polvo de suero desmineralizado reconstituido al 10%) la actividad de la bacteriocina fue de 10,24() UA/mL. El fermento se sometió a pasteurización para inactivar el cultivo productor de bacteriocina DPC 3147.

La pasteurización no tuvo ningún efecto en la actividad de la bacteriocina (Figura 2). La evaporación (del 10 al 40% de sólidos totales) produjo una concentración del fermento y provocó un aumento de la actividad de la bacteriocina a 40,960 UA/mL. Después de la cristalización durante la noche, la actividad del concentrado permaneció estable. El secado por atomización del concentrado dio como resultado la producción de un polvo activo. Cuando el polvo secado por atomización se resuspendió a una concentración de 50 mg/mL (5% de los sólidos) contenía 5120 UA lo que indicaba que la actividad del polvo de lacticina era de 102400 UA/g (100% de los sólidos). La actividad de la lacticina 3147 expresada como UA/g de materia seca permaneció durante todo el proceso de fabricación a un valor constante de 102400 UA/g, lo que indicaba que no se había producido pérdida de la actividad de la bacteriocina durante la fabricación.

La actividad inhibitoria del polvo enriquecido con bacteriocina se atribuyó a la acción de la lacticina 3147 más que a otros metabolitos de la fermentación tales como el ácido láctico, ya que inhibió una *L. lactis* MG1614 sensible pero no mostró ningún efecto inhibitorio frente a un trasconjugante que contenía el plásmido pMRC01.

Efecto del polvo de lacticina 3147 en los agentes patógenos

El polvo de suero desmineralizado enriquecido con lacticina 3147 (polvo de lacticina 3147) se investigó por su capacidad para inhibir dos patógenos formados en los alimentos. El efecto inhibitorio del polvo se investigó a pH 5 y a pH 7, en presencia y en ausencia de 10mM de glucosa. La eficacia de una disolución al 10% (peso/volumen) de polvo de lacticina 3147 frente a células en fase de crecimiento exponencial medio de *L. monocytogenes* Scott A demostró que aproximadamente una reducción de 3,3 log (99,95% del nivel de eliminación) podía alcanzarse a pH 5 al cabo de 3 horas a 30°C (Figura 3A). La eliminación de *L. monocytogenes* Scott A con una solución al 10% (peso/volumen) fue algo más eficaz a pH 7 (Figura 3B). Se observó una reducción de 3,8 log (99,98% nivel de eliminación) al cabo de 3 horas a 30°C.

Se descubrió que *S. aureus* 10 era más resistente que *L. monocytogenes* Scott A a la acción del polvo enriquecido en lacticina, por lo que se utilizó una disolución del polvo al 15%. La eficacia de una disolución al 15% (peso/volumen) de polvo de lacticina 3147 frente a células en fase exponencial media de *S. aureus* 10 resultó en aproximadamente una reducción de 1,1 log (90,4% nivel de eliminación) a un pH 5 al cabo de 3 horas a 30°C (Figura 4A). La capacidad de eliminación de una disolución al 15% (peso/volumen) de un polvo de lacticina aumentó enormemente a pH 7 donde al cabo de 3 horas a 30°C se observó casi una reducción de 4 log (99,98% nivel de eliminación) de *S. aureus* 10 (Figura 4B). La inclusión de 10 mM de glucosa produjo sólo pequeños aumentos en el nivel de muertes celulares tanto para *L. monocytogenes* Scott A como para *S. aureus* 10 (no se muestran los resultados).

Efecto del polvo de lacticina 3147 frente a L. monocytogenes Scott a en una formulación de leche para lactantes

Para analizar la eficacia del polvo de lacticina 3147 en un sistema alimentario, se llevaron a cabo experimentos en una fórmula de leche para lactantes, puesto que es un ejemplo de alimento destinado a un tipo de consumidor de alto riesgo que contiene polvo de lactosuero desmineralizado como un constituyente principal. Los resultados indicaron que se obtuvo más de un 99% de nivel de eliminación de *L. monocytogenes* Scott A cuando parte de la formulación de leche para lactantes se sustituyó por dos terceras partes (10% de polvo de lacticina y 5% de polvo de leche para lactantes) o una tercera parte de polvo de lacticina 3147 (5% polvo de lacticina y 10% de polvo de

leche para lactantes) (Figura 5). Los recuentos se redujeron en este caso desde aproximadamente 7×10^4 ufc/mL a 3×10^1 ufc/mL al cabo de 3 horas a 30°C. En el cultivo de control sin polvo de lacticina 3147 presente los recuentos aumentaron de aproximadamente 10^4 ufc/mL a aproximadamente 10^5 ufc/mL al cabo del mismo intervalo de tiempo.

5 Aplicación del polvo de lacticina 3147 en una variedad de alimentos

La lacticina 3147 en polvo se ha evaluado para la inhibición del deterioro de alimentos y microorganismos patógenos en diversos sistemas alimentarios incluyendo formulaciones de alimentos para lactantes, sopa en polvo, queso cremoso cuajado y yogur natural. Los siguientes son ejemplos específicos del uso de lacticina 3147 para inhibir patógenos en sistemas alimentarios.

Inicialmente se investigó la capacidad del polvo de lacticina 3147 para inhibir *Listeria monocytogenes* Scott A en una formulación de leche para lactantes de la manera descrita anteriormente. Para investigar posteriormente el efecto inhibitorio del polvo de lacticina 3147, se llevaron a cabo pruebas de inactivación frente a diversos microorganismos diferentes en un yogur natural, en queso cremoso cuajado y en sopa de sobre reconstituida, con valores de pH de 4,5, de 4,4 y 6,6 respectivamente.

El efecto del polvo de lacticina 3147 al 10% en la inhibición de *Listeria monocytogenes* Scott A (10^4 ufc/mL) en yogur natural demostró que más del 98,3% del cultivo fue eliminado al cabo de 5 minutos a 30°C. Al cabo de 60 minutos no quedaban células viables (Figura 6).

En el caso del queso cremoso cuajado (tipo *cottage*) inoculado con 10^4 ufc/mL de *Listeria monocytogenes* se eliminó el 40% de la población al cabo de 5 minutos a 30°C en presencia de un 10% de polvo de lacticina 3147. Después de 160 minutos sólo el 14% de la población permanecía viable. (Figura 7).

El efecto correspondiente a concentraciones del 1, del 5 y del 10% de lacticina 3147 en sopa en polvo frente a *Bacillus cereus* a 30°C, demostró que tras 24 horas de incubación se observaba más del 99,9% de nivel de eliminación en presencia de concentraciones de polvo de lacticina 3147 del 5 y del 10%. En el caso de la concentración de lacticina 3147 del 1% sobrevivió un 17% de la población (Figura 8).

Se llevó a cabo un estudio similar para determinar el efecto de concentraciones del 1, del 5 y del 10% de polvo de lacticina 3147 en la supervivencia de *Listeria monocytogenes* Scott A en sopa en polvo. Una concentración de un 1% de lacticina fue inefectiva para inhibir Scott A en 24 horas, mientras que a una concentración del 5% más del 10% de la población estaba inhibida. A una concentración del 10% más del 40% del cultivo estaba inhibido (Figura 9).

A partir de estos resultados se puede observar que una forma en polvo de lacticina 3147 tiene de hecho más aplicaciones en la seguridad de los alimentos para el control de agentes patógenos en los alimentos y organismos de deterioro.

40 Efecto de la presión hidrostática

Se evaluó en la leche y en el lactosuero el uso de presión hidrostática y de tratamientos con lacticina 3147 con el objetivo de combinar ambos tratamientos para mejorar la calidad de los alimentos lácteos mínimamente procesados. El sistema se evaluó utilizando dos agentes patógenos presentes en los alimentos. *Staphylococcus aureus* ATCC6538 y *Listeria innocua* DPC1770. Se llevaron a cabo pruebas frente a *Staph. aureus* ATCC6538 utilizando lacticina 3147 concentrada preparada a partir de cultivo sobrenadante. Los resultados demostraron más de un efecto aditivo cuando ambos tratamientos fueron utilizados en combinación, por ejemplo, la combinación de 250 MPa (reducción de 2,2 log) con lacticina 3147 (reducción de 1 log) resultó en una reducción de más de 6 log (Figura 10). Unos resultados similares se obtuvieron cuando se analizó una forma en polvo de calidad alimentaria de lacticina 3147 (desarrollada a partir de una fermentación de polvo de suero desmineralizado reconstituido secado por atomización) para la inactivación de *L. innocua* DPC 1770 (Figura 11). Además, se observó que el tratamiento de las preparaciones de lacticina 3147 con presiones superiores a 400 MPa dieron como resultado un aumento en la actividad de la bacteriocina (equivalente a doblar la actividad). Estos resultados indican que una combinación de alta presión con lacticina 3147 es apropiada para mejorar la calidad de alimentos mínimamente procesados a niveles de presión hidrostática menores.

55 Discusión

Se consiguió desarrollar un ingrediente alimentario bioactivo derivado del suero después de investigaciones acerca de la producción de lacticina 3147 en medios diferentes. La actividad de la lacticina 3147 era alta en todos los medios derivados de productos lácteos investigados, aparte del concentrado de proteína de suero (WPC35). Una posible explicación para el bajo nivel de actividad en el concentrado de proteína de suero podría ser que la actividad de la bacteriocina se repartiera en el interior de la pastilla durante la centrifugación, antes de analizar la actividad. Se investigaron dos medios sintéticos para la producción de lacticina 3147, caldo de LM17 (20) y caldo de TY (15). Los niveles de actividad de la lacticina 3147 en LM17 resultaron comparables a los de medios derivados de productos lácteos, pero esto no resulta sorprendente, puesto que estos medios se desarrollaron para el cultivo de lactococos. Sin embargo, el caldo TY, en el que se observaron unos niveles bajos de actividad de la lacticina 3147, se desarrolló para proporcionar una obtención óptima de bacteriocina (enterocina 1146) mientras se minimizan los niveles de péptidos en el medio (para eliminar péptidos que puedan interferir en la purificación). Es claramente ventajoso utilizar los

medios de cultivo más rentables económicamente para el desarrollo de un polvo. Se investigó el polvo de lactosuero desmineralizado, medio que se puede adquirir fácilmente y es rentable (20 \$ por cada 25 kg), para la optimización de la producción de lacticina 3147. Sin embargo, podrían utilizarse otros medios de cultivo apropiados, tal como se ha descrito anteriormente.

El efecto del pH en la producción de bacteriocina ha sido bien documentado, y para diversas cepas productoras de bacteriocina, el control del pH durante el crecimiento da lugar a mayores valoraciones de bacteriocina (11, 14, 18). La actividad de la lacticina 3147 aumentó enormemente cuando el pH de los medios de crecimiento se mantuvo constante a 6,5. A este pH se observaron los cinco valores cuantitativos de bacteriocina más altos y los números mayores de células. Los valores cuantitativos de bacteriocina menores y las menores cantidades de células se observaron cuando no se impuso control de pH. La actividad aumentada de la bacteriocina se correspondió con las cantidades aumentadas de células.

Una vez que la obtención de lacticina 3147 se hubo optimizado en un polvo de suero desmineralizado reconstituido al 10%, se instaló una fermentación a escala para generar suficientes fermentos para el secado por atomización. La producción de un polvo activo secado por atomización demostró la resistencia de la bacteriocina a las condiciones extremas del proceso. Durante todo el proceso se detectó actividad y el polvo final tuvo una actividad de 102.400 UA/g de materia seca, equivalente a la actividad presente al comienzo del proceso. Este resultado sorprendente es significativo en la medida en que sugiere que no se produjo pérdida de actividad durante la fabricación.

El análisis de la actividad inhibitoria del polvo bioactivo demostró que puede inhibir tanto *L. monocytogenes* como *S. aureus* a pH 5 y pH 7. En ambos casos el polvo bioactivo presentó una mayor capacidad de eliminación a pH neutro. Esto es un hallazgo significativo, ya que se sabe que el Nisaplin, un ingrediente alimentario fermentado utilizado para la extensión del tiempo de almacenamiento sin refrigeración del producto y para la prevención del deterioro tiene la máxima eficacia a pH ácido (pH por debajo de 6,0). El desarrollo de un ingrediente alimentario capaz de eliminar bacterias grampositivas a pH neutro indica que el polvo de lacticina 3147 puede ser adecuado para la incorporación a una amplia variedad de alimentos, para los que no existían hasta ahora posibilidades de prevención del deterioro de los alimentos/de la patogénesis, aparte de la adición de conservantes químicos.

Se ha descubierto el mecanismo de acción de la lacticina 3147 (12). Provoca la muerte celular al permeabilizar las membranas de células sensibles a través de la formación de poros, permitiendo el flujo de salida de iones K^+ y fosfato. Esta acción provoca y la disipación de la fuerza motora de los protones, la hidrólisis del ATP intracelular y finalmente produce la muerte celular. Las células excitadas son más susceptibles a la acción de la lacticina 3147. Las células incubadas en presencia de polvo de lacticina combinadas con 10 mM de glucosa presentaron unos aumentos ligeros en la eficacia de eliminación (aparte del *S. aureus* 10 a pH 7, resultados no mostrados). Esto está en consonancia con los resultados proporcionados por McAuliffe *et al.*, (12), donde se observó que las células excitadas eran más sensibles a la lacticina 3147. Las células excitadas tienen una fuerza motora de protones que puede favorecer la inserción de moléculas de lacticina 3147 en la membrana, tal como ocurre con la nisina, un formador de poros lantibióticos (7, 8).

El desarrollo de una forma en polvo de lacticina 3147 permitiría aplicarlo a diversos sistemas alimentarios. Puesto que el polvo de lacticina 3147 existente se ha desarrollado a partir de un polvo de lactosuero desmineralizado, este polvo tiene aplicaciones en todos los alimentos donde el polvo de lactosuero desmineralizado constituye un ingrediente. Por ejemplo el polvo de lactosuero desmineralizado se incorpora a diversos alimentos como por ejemplo formulaciones de leche para lactantes. Los resultados que se presentan en este documento demuestran la capacidad de este polvo de inactivar eficazmente el 99% de *L. monocytogenes* Scott A añadido a formulaciones para lactantes, donde parte del polvo de leche para lactantes ha sido sustituido con el polvo de lacticina 3147. Las formulaciones de leche para lactantes se fabrican para alcanzar la mejor calidad posible y los incidentes asociados a enfermedades producidas por los alimentos son raros. Sin embargo, las formulaciones de leche para lactantes son más susceptibles a la contaminación por contaminantes habituales en el medio doméstico que muchos otros alimentos, poniendo en riesgo la salud de los lactantes. Por esta razón la adición de un polvo enriquecido con lacticina 3147 en dichas formulaciones puede proporcionar un aumento de la protección en el caso de que se produzca alguna contaminación, lo que sería beneficioso tanto para los fabricantes como para los consumidores.

Para los fabricantes que ya utilizan polvo de lactosuero desmineralizado como ingrediente alimentario debería resultar posible sustituir este polvo (parcial o totalmente) con un polvo de lactosuero desmineralizado bioactivo para salvaguardar los productos alimentarios del deterioro y de los organismos patógenos grampositivos. Y de hecho, para los fabricantes que no utilizan polvo de lactosuero desmineralizado como ingrediente alimentario la adición de bajos niveles del polvo bioactivo podría ser suficiente para conferir una mayor protección sin afectar a las características sensoriales o funcionales de estos alimentos. Sin embargo, resulta también evidente que mediante la presente invención podría obtenerse también un polvo de lacticina 3147 secado por atomización derivado de un medio distinto de un polvo de lactosuero. Dicho polvo puede emplearse como sustituto en áreas donde no se utiliza polvo de lactosuero, con los mismos efectos beneficiosos.

Resumen

La lacticina 3147 de gama amplia, producida por *Lactococcus lactis* DPC3147, inhibe una gran variedad de organismos grampositivos que deterioran los alimentos y de organismos patógenos. Una solución al 10% de polvo de suero desmineralizado se fermentó con DPC3147 a un pH constante de 6,5. El fermento se secó por atomización y

el polvo resultante mostró actividad inhibidora. La capacidad del polvo enriquecido en lacticina 3147 para inhibir *Listeria monocytogenes* Scott A y *Staphylococcus aureus* 10 se analizó en una disolución amortiguadora de pH, tanto a pH ácido (pH 5) como a pH neutro (pH 7). Además, se analizó la capacidad del polvo para inhibir *L. monocytogenes* Scott A en una formulación de leche para lactantes. La resuspensión de células de *L. monocytogenes* Scott A en fase exponencial media S.3 log en una disolución al 10% del polvo enriquecido con lacticina 3147 produjo una reducción de 1000 veces en células viables a pH 5 y a pH 7 después de 3 horas a 30°C. En el caso de *S. aureus* 10, la resuspensión de $2,5 \times 10^7$ células en fase exponencial media en una disolución al 15% del polvo enriquecido con lacticina 3147 produjo sólo una reducción de 10 veces en recuentos de células viables, comparado con una reducción de 1000 veces a pH 7, después de incubación a 30°C durante 3 horas. En una formulación de leche para lactantes el uso del polvo de lacticina 3147 produjo más del 99% de eliminación de *L. monocytogenes* al cabo de 3 horas a 30°C. De manera similar, el polvo de lacticina 3147 mostró ser eficaz en la inhibición del deterioro de alimentos en sopa en polvo, en yogur y en queso cremoso cuajado. Además, la combinación de presión hidrostática y lacticina 3147 causa un aumento en el tasa de eliminación, constituyendo esto un método atractivo de prevención del deterioro en productos alimentarios mínimamente procesados. Por lo tanto este ingrediente alimentario de lacticina 3147 bioactiva encontrará aplicaciones en una gran variedad de alimentos, entre ellos aquellos con pH próximo al neutro.

Bibliografía

2. **Buzby, J.C., T. Roberts, C.T.J. Lin, J.M. y MacDonald.** 1996. Bacterial food-borne disease: medical costs and productivity losses. Food and consumer economics division, economic research service U.S. Department of Agriculture. *Agricultural Economic Report* No. 741.
3. **Coakley M., G. F. Fitzgerald y R. P. Ross.** 1997. Application and evaluation of the phage resistance and bacteriocin-encoding plasmid pMRC01 for the improvement of dairy starter cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1434-1440.
4. **Daeschel, M. A.** 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 43:164-167
6. **Dougherty, B., C. Hill, J. F. Weidman, D. R. Richardson, J. C. Venter, y R. P. Ross.** Sequence and analysis of the 60 kb conjugative, bacteriocin producing plasmid pMRC01 from *Lactococcus lactis* DPC3147. *Mol. Microbiol.* (in press).
7. **Driessen, A. J. M., H. W. van der Hooven, W. Kuiper, M. van de Kamp, H.-G. Sahl, R. N. H. Konings y W. N. Konings.** 1995. Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilisation of phospholipid vesicles. *Biochem.* 34: 1606-1614.
8. **Garcia-Garcera, M. J., M. G. M. Elferink, A. J. M. Driessen y W.N. Konings.** 1993. *In vitro* pore-forming activity of the lantibiotic nisin: role of protonmotive-force and lipid composition. *Eur. J. Biochem.* 212:417-422.
10. **Hurst, A.** 1983. Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. p. 327-351- In: P. M. Davidson y A. L. Branen, (cd.). *Antimicrobials in food*. Marcel Dekker, New York.
11. **Joerger, M. C. y T. R. Klaenhammer,** 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.* 167:439-446
12. **McAuliffe, O., M. P. Ryan, R. P. Ross, C. Hill. P. Breeuwer y T. Abee.** 1998. Lacticina 3147: a broad spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:439-445.
13. **McAuliffe, O., C. Hill y R.P Ross.** 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese manufactured with a lacticina 3147 producing starter culture. Submitted for publication: *J. Appl. Microbiol.*
14. **Muriana, P. M. y T. R. Klaenhammer.** 1987. Conjugal transfer of plasmid encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:553-560.
15. **Parente, E. y C. Hill.** 1992. A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 73:290-298.
17. **Ryan, M. P., M. C. Rea, C. Hill y R. P. Ross.** 1996. An application in Cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticina 3147. *Appl. Environ. Microbio.* 62: 612-619.
18. **Schillinger, U., M. E. Stiles y W. H. Holzapfel.** 1993. Bacteriocin production by *Carnobacterium piscicola* LV61. *Int. J. Food Microbiol.* 20:131-147.
20. **Terzaghi, B. E. y W. E. Sandine.** 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 29:807-813.

21. **Stiles, M.E.** 1996. Biopreservation of lactic acid bacteria. In lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications (Venema, G. huis in't Veld, J.H.J. and Hugenholtz, J. eds.) Proceedings of the Fifth Symposium, veldhoven, the Netherlands. 235-249. Kluwer Academic Publishers.

- 5 Las expresiones “comprende/que comprende” y las expresiones “que presenta/que incluye” aquí utilizadas en la presente memoria según la presente invención se utilizan para especificar la presencia de características detalladas, de unidades, de pasos o de componentes pero no excluye la presencia o adición de una o varias características, de unidades, de pasos, de componentes o de grupos de los mismos.

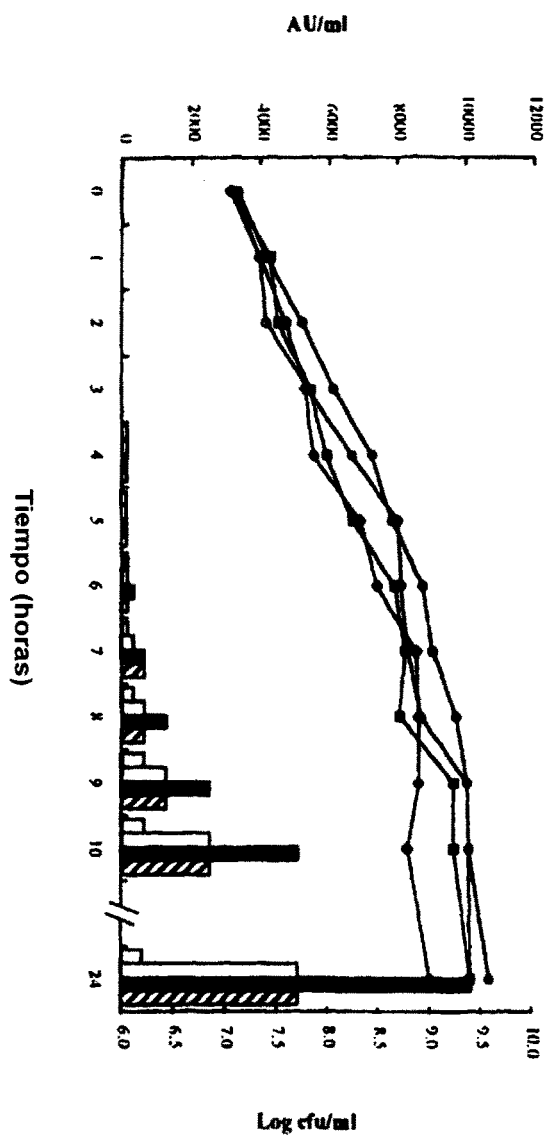
10 TABLA 1

Actividad de la lacticina 3147 en varios medios tras incubación durante toda la noche a 30°C

Medios de crecimiento	Actividad de la lacticina 3147 (UA/mL)
Suero de queso Cheddar	2560
Leche entera	2560
Polvo de leche desnatada reconstituida	1280
Polvo de suero desmineralizado reconstituido	1280
Concentrado de proteína de suero (WPC35)	320
LM17	2560
Caldo TY	640

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la obtención de polvo de lacticina 3147 secado por atomización, para utilizar como ingrediente alimentario, que comprende
- (a) la inoculación de un medio con una cepa de bacterias productoras de lacticina 3147;
- 10 (b) la fermentación del medio inoculado;
- (c) el ajuste del pH de la fermentación entre 6,3 y 6,7;
- (d) la inactivación del fermento bacteriano:
- 15 (e) la evaporación del fermento de la etapa (d);
- (f) el secado por atomización del polvo obtenido en la etapa (e).
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el medio se selecciona de entre polvos de leche o polvos de productos lácteos que incluyen polvo de lactosuero desmineralizado, polvo de leche desnatada reconstituida, polvo de concentrado de proteínas de lactosuero, leche entera pasteurizada, lactosuero de queso Cheddar, polvos de levadura o medios o caldos sintéticos de tipo laboratorio.
- 25 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el medio de tipo laboratorio es caldo de LM 17 o de TY.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el concentrado de la etapa (e) se enfría, se siembra con lactosa a razón de aproximadamente 0,1% en peso y se deja cristalizar a una velocidad de enfriamiento de aproximadamente 1°C por hora.
- 30 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio inoculado se fermenta a aproximadamente 30°C durante aproximadamente 6 a 24 horas.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el pH de la fermentación se ajusta a aproximadamente 6,5.
- 35 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el fermento inactiva por pasteurización o tratamiento a una temperatura muy elevada.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el fermento se pasteuriza a aproximadamente 72°C durante aproximadamente 15 minutos.
- 40 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el fermento de la etapa (d) se evapora a aproximadamente 60°C hasta obtener aproximadamente el 40% de los sólidos totales.

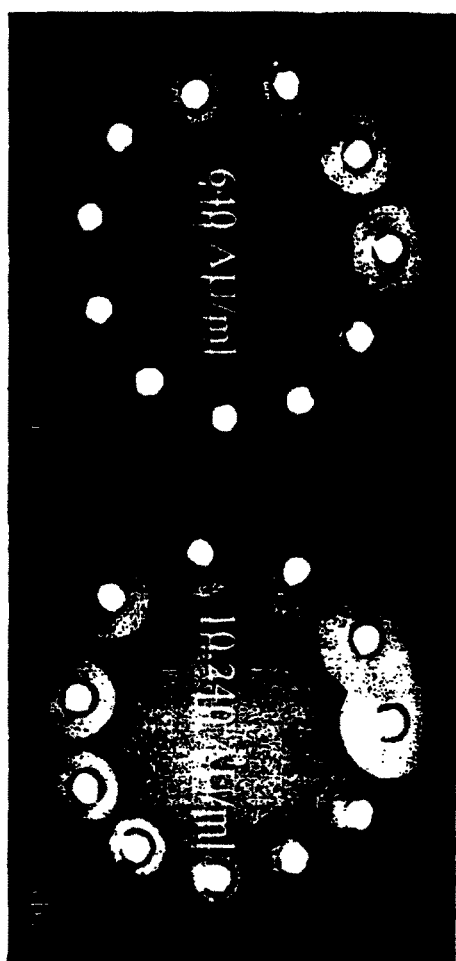


(A)

Tiempo (horas)

AU/ml

Log cfu/ml



(B)

FIG. 1

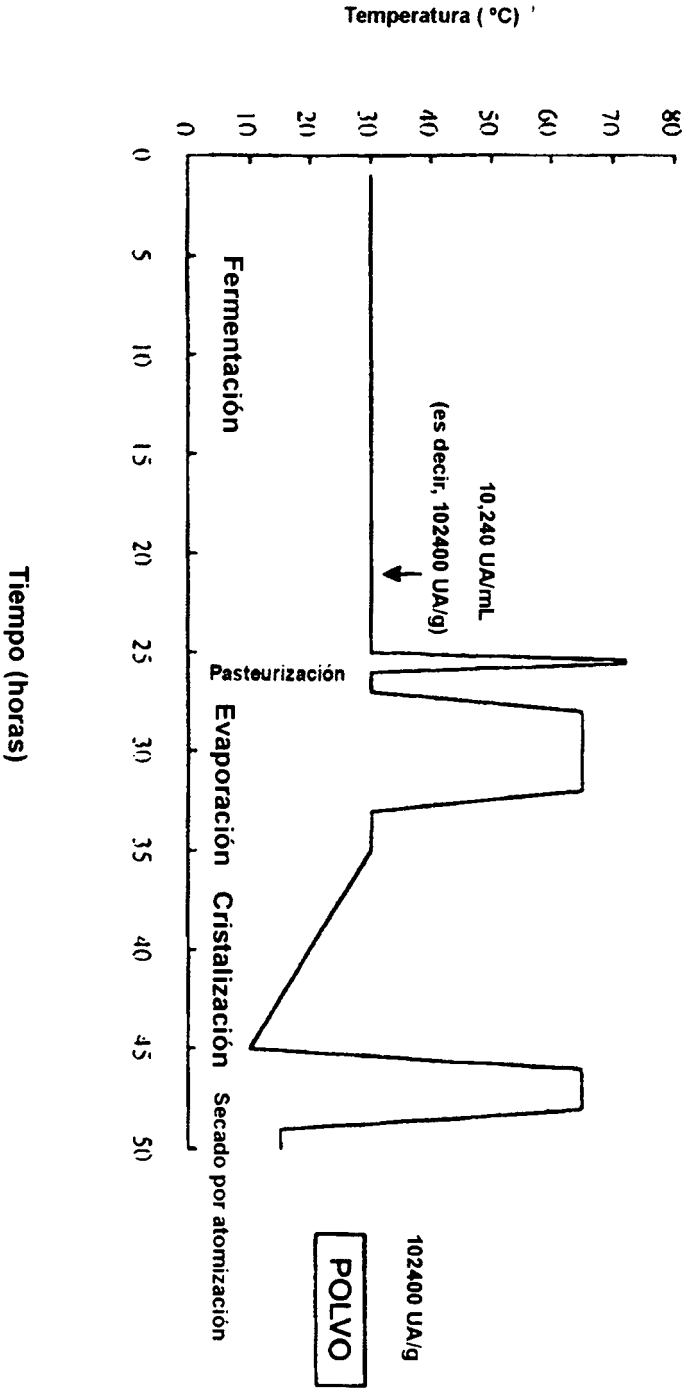


FIG. 2

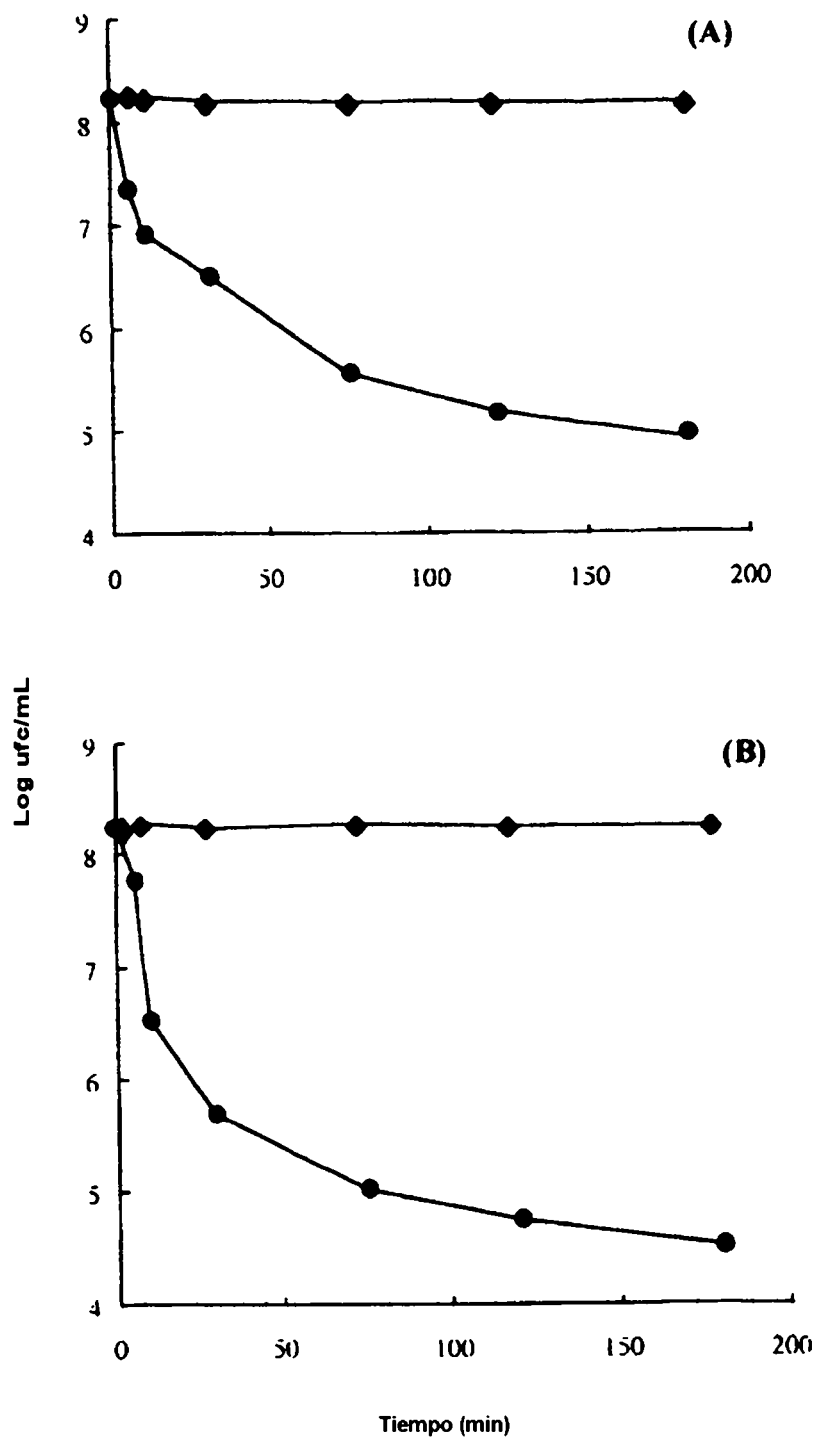


FIG. 3

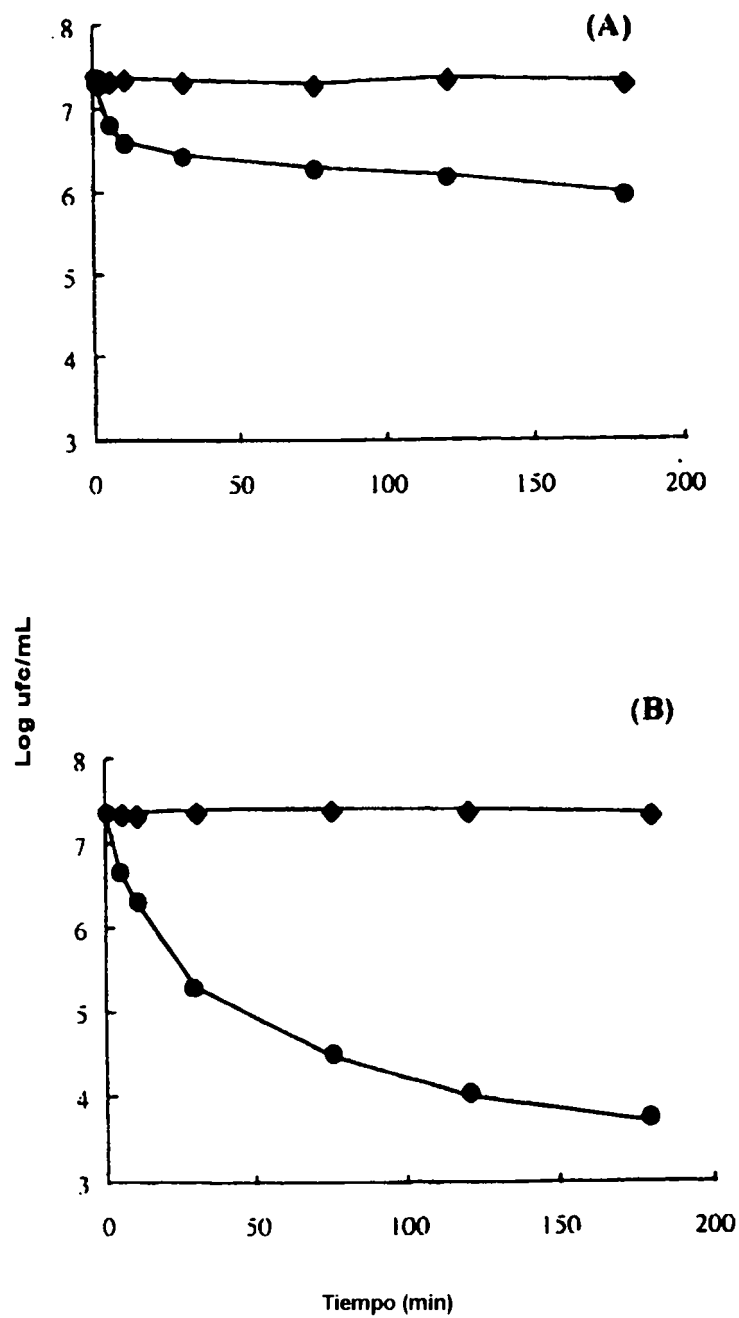


FIG. 4

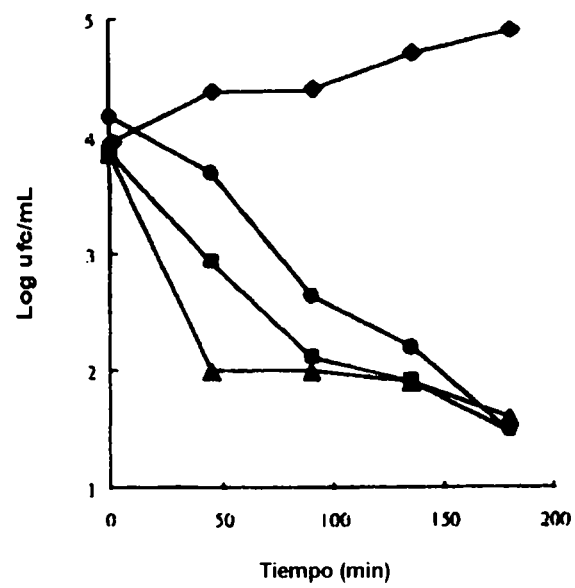
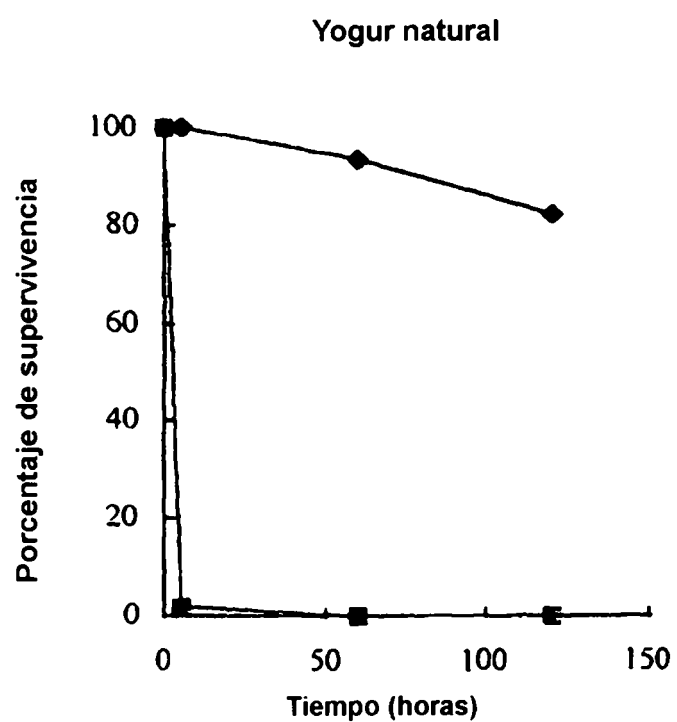


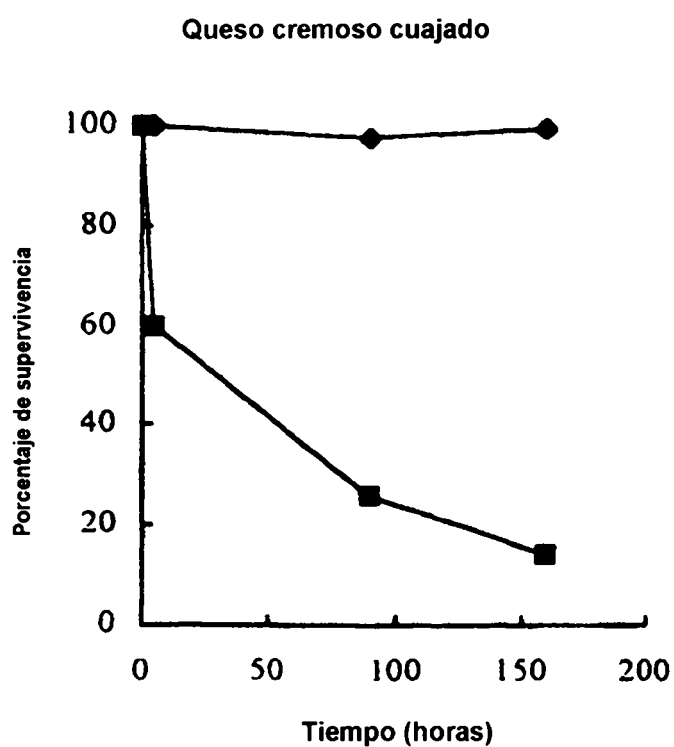
FIG. 5



Efecto del polvo de lacticina 3147 (10%) en la viabilidad de *Listeria monocytogenes* Scott A en el yogur (♦) sin adición de lacticina 3147, (■) adición de lacticina 3147 al 10%.

El 10% se refiere aquí a 10 g de polvo de lacticina 3147 añadidos a 90 g de yogur.

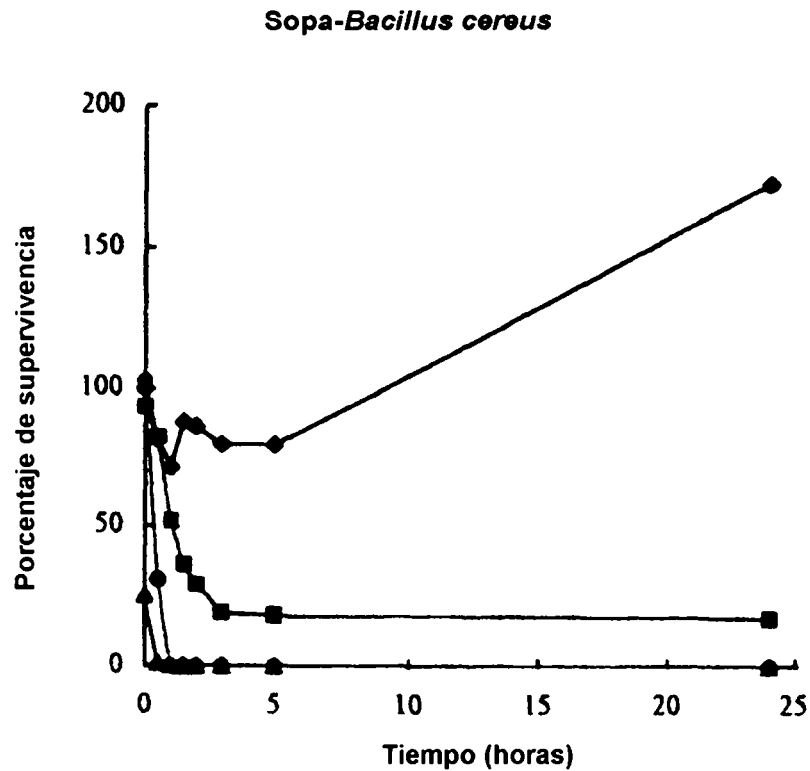
FIG. 6



Efecto del polvo de lacticina 3147 (10%) en la viabilidad de *Listeria monocytogenes* Scott A en el queso cremoso cuajado (♦) sin adición de lacticina 3147, (■) adición de lacticina 3147 al 10%.

El 10% se refiere aquí a 10 g de polvo de lacticina 3147 añadidos a 90 g de queso cremoso cuajado.

FIG. 7

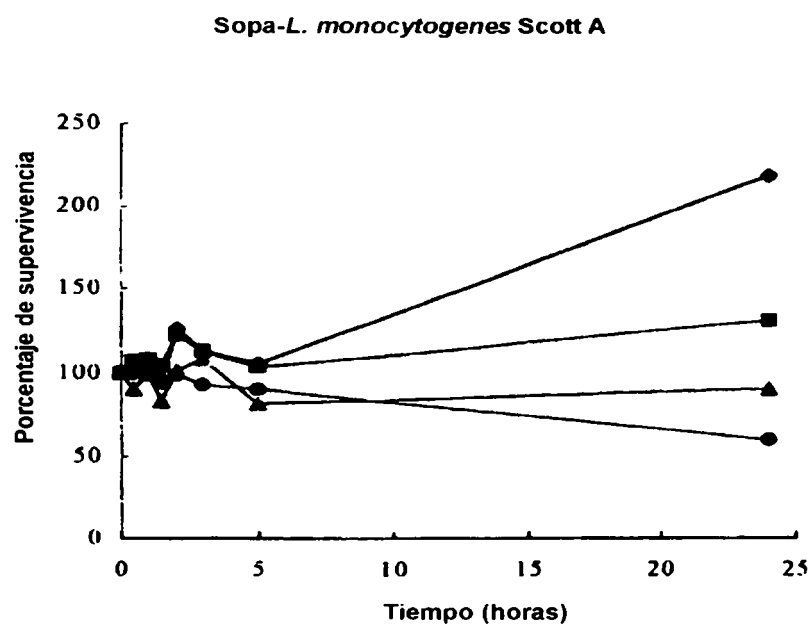


Efecto del polvo de lacticina 3147 (10%) en la viabilidad de *Bacillus cereus* en sopa (de sobre)

- (♦) sin adición de lacticina 3147,
- (■) adición de lacticina 3147 al 1%
- (▲) adición de lacticina 3147 al 5%
- (●) adición de lacticina 3147 al 10%

El 1, 5, 10% se refiere aquí a 1, 5 ó 10 g de polvo de lacticina 3147 añadidos a 99, 95 o 90 g de polvo de sopa de sobre, luego reconstituido a las instrucciones del fabricante.

FIG. 8

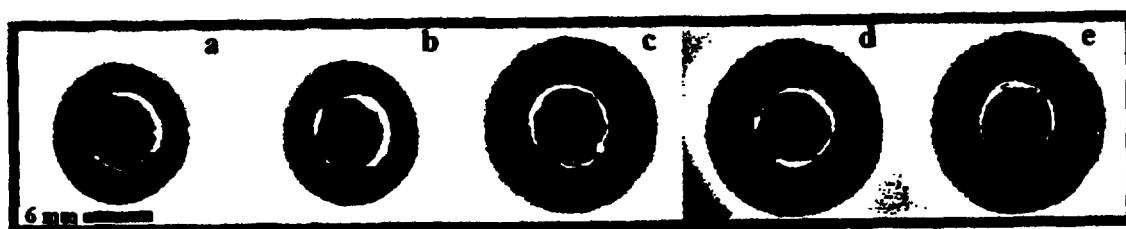


Efecto del polvo de lacticina 3147 (10%) en la viabilidad de *Listeria monocytogenes* Scott en sopa (de sobre)

- (♦) sin adición de lacticina 3147,
- (■) adición de lacticina 3147 al 1%
- (▲) adición de lacticina 3147 al 5%
- (●) adición de lacticina 3147 al 10%

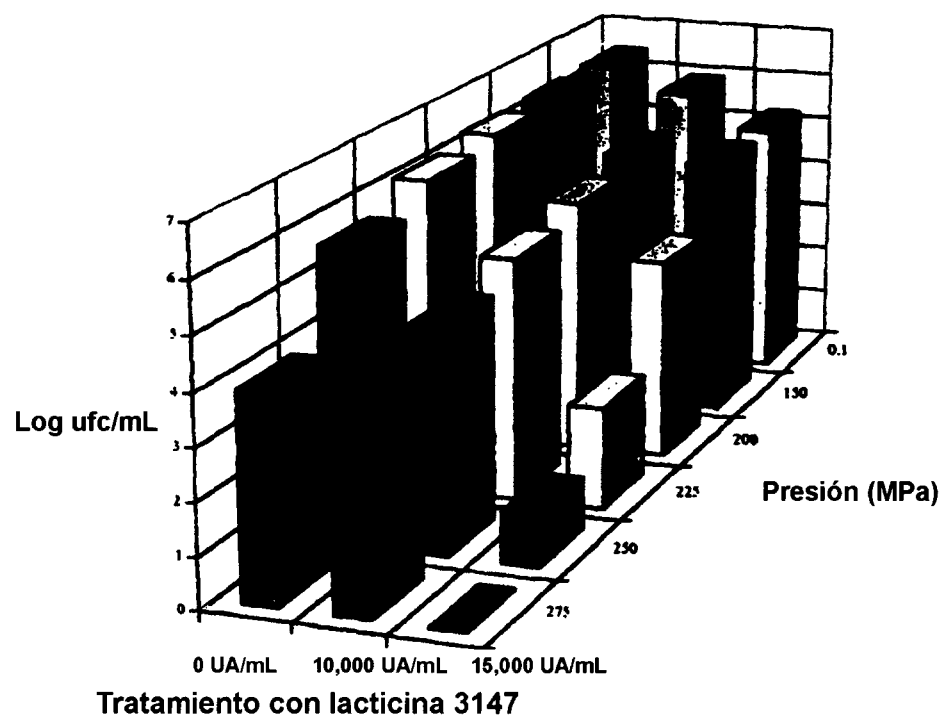
El 1, 5, 10% se refiere aquí a 1, 5 o 10 g de polvo de lacticina 3147 añadidos a 99, 95 o 90 g de polvo de sopa de sobre, luego reconstituido a las instrucciones del fabricante.

FIG. 9



**El efecto de las presiones aumentadas en la actividad de la lacticina 3147,
(a) presión atmosférica, (b) 200 MPa, (c) 400 MPa, (d) 600 Mpa y (e) 800 MPa.**

FIG. 10



El efecto de la alta presión y de la lacticina 3147 en viabilidad de *L. innocua* DPC1770.

FIG. 11