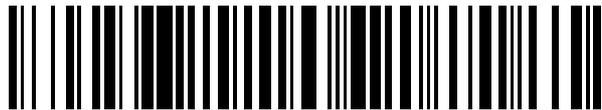


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 622**

21 Número de solicitud: 201200456

51 Int. Cl.:

C12P 7/42 (2006.01)

C12P 7/56 (2006.01)

C12R 1/25 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

03.05.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

08.11.2013

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE VIGO (100.0%)
Campus Universitario s/n
36310 Vigo (Pontevedra) ES**

72 Inventor/es:

**RODRÍGUEZ PAZO, Noelia y
DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ, José Manuel**

54 Título: **Proceso para la producción de extractos antimicrobianos a partir de suero lácteo y vinazas**

57 Resumen:

El objeto de esta invención es la formulación de un medio de cultivo a partir del suero lácteo para la producción de extractos antimicrobianos por cepas de *Lactobacillus plantarum*. Se reivindica la utilización de suero lácteo, -nocivo para el medioambiente, como fuente de carbono, así como para la generación de disoluciones de fenilalanina por hidrólisis enzimática, y posterior conversión simultánea y conjunta en aditivos antimicrobianos, el ácido láctico, el ácido feniláctico y las bacteriocinas, por bioprocesos llevados a cabo en continuo o discontinuo. Adicionalmente se pueden emplear lías de vinificación destiladas (o vinazas) para la formulación de medios fermentativos económicos, durante la producción de estos extractos antimicrobianos por *Lactobacillus plantarum*.

ES 2 428 622 A1

DESCRIPCIÓN**Proceso para la producción de extractos antimicrobianos a partir de suero lácteo y vinazas****Estado de la técnica**

5

La producción de aditivos alimentarios de carácter natural que permitan obtener productos de gran calidad resulta interesante para darle respuesta a las demandas de la sociedad actual, relacionadas con la calidad, salud y seguridad de los alimentos, al tiempo que se incrementa la competitividad de nuestra industria alimentaria, para poder alcanzar una mayor dimensión internacional. Debido a esto, en la actualidad se identifican serios problemas relacionados directamente con la forma de conservación de los alimentos frescos derivados del hecho de la continua exigencia por parte de los consumidores y administración de disminuir y substituir el uso de conservantes y aditivos químicos en los alimentos por los naturales y obtenidos biotecnológicamente, como consecuencia a los efectos adversos que pueden causar los primeros en la salud del consumidor. Esto obliga a la búsqueda de metodologías alternativas económicamente rentables. En este sentido, los residuos industriales constituyen una fuente de materia prima económica y renovable. Al mismo tiempo, el empleo de estos residuos industriales para la producción biotecnológica de metabolitos de interés industrial, reduce el impacto ambiental de las empresas que los generan así como los revaloriza como fuente económica y renovable para la obtención de estos metabolitos.

La industria del queso es un subsector de gran importancia en España que genera gran cantidad de diversos residuos, de entre los que cabe destacar, debido a su gran cantidad y posteriores problemas medioambientales el suero lácteo o lactosuero. Este suero lácteo se produce en las industrias lácteas durante el proceso de elaboración del queso tras la separación del mismo de la cuajada por filtración mediante el proceso denominado desuerado. El suero lácteo representa entre un 80 y un 90% del volumen total de la leche utilizada en la fabricación de queso, y contiene alrededor del 50% de los nutrientes iniciales de la misma (En la Tabla 1 se muestra la composición media del mismo). La gran cantidad de suero que se produce en una empresa de elaboración de quesos y sus características contaminantes, fundamentalmente la muy elevada carga orgánica (40.000-80.000 mg O₂/L) y por tanto elevada DBO, DQO y conductividad, obligan a recuperar todo este suero y evitar su vertido al colector de aguas residuales.

Del mismo modo, la viticultura es un subsector de gran importancia en España que genera grandes cantidades de residuos, entre los que cabe señalar las lías de vinificación. De acuerdo con el Reglamento del Consejo Europeo 1493/1999, por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola, estas lías deben ser enviadas a destilerías de alcohol, produciendo así lías destiladas o vinazas, las cuales representan elevados volúmenes de residuo con una alta carga orgánica. La DQO y DBO se sitúa en 21.715 y 13.440 mg/L respectivamente (Beltrán y col., 1999). El porcentaje total de lías se sitúa en torno al 2% en peso de los kilogramos de uvas empleadas.

Las lías se producen en las propias bodegas durante el proceso de elaboración del vino. A medida que transcurre la fermentación del mosto en vino, las levaduras muertas se van depositando en el fondo de las cubas o toneles. Junto con las levaduras se depositan también otros organismos (principalmente bacterias), materia orgánica (proteínas, taninos...), sólidos minerales, y otros materiales como sólidos empleados en la clarificación, originándose un depósito de composición heterogénea que generalmente no es conveniente que permanezca en contacto con el vino, ya que le podría transmitir sabores indeseables en un corto período de tiempo. Para separarlas, se requiere un trasiego o cambio del vino de un recipiente a otro.

Las lías procedentes de la fermentación se destilan en bodega o destilerías, para recuperar alcoholes y sustancias aromáticas, quedando por tanto unas lías empobrecidas en estos compuestos. Su composición varía en función del trasiego del que procedan. Estas lías destiladas se procesan parcialmente junto con otros lodos residuales en depuradoras para tratar de disminuir en la medida de lo posible su impacto ecológico. El resto son vertidas a ríos y lagos en el peor de los casos, o bien recogidas por empresas que en su actividad industrial incluyen la gestión de este tipo de residuos mediante la recuperación de productos de interés como el ácido tartárico.

Las bacteriocinas son proteínas o péptidos biológicamente activos con actividad antimicrobiana producidos por síntesis ribosomal y segregados por un gran número de bacterias para inhibir microorganismos competidores (Katikou, 2005; Motta y col.,

2008). Estas sustancias con frecuencia actúan frente a grupos bacterianos estrechamente relacionados con la cepa productora (fundamentalmente gram positivas, más raramente gram negativas). Sin embargo, estudios recientes afirman que también pueden actuar frente a otras especies bacterianas taxonómicamente distantes e incluso frente a hongos y algunos parásitos (Cotter y col., 2005; Svetoch y col., 2008).

En la actualidad, las bacteriocinas producidas por las bacterias ácido lácticas poseen un gran interés como agentes bioconservantes por diversos factores, de los que se destacan:

- 10 ▪ Poseen estatus de QPS (Qualified Presumption of Safety) ya que son producidas por microorganismos reconocidos generalmente como GRAS (Generally Recognized As Safe), es decir, tanto ellos como los metabolitos que producen son considerados seguros para la salud ya que han sido consumidos en alimentos fermentados por innumerables generaciones sin que se hayan observado efectos adversos en la población (Joerger, 2002; Drider y col., 2006; 15 Millete y col., 2008).
- Debido a su naturaleza peptídica son degradadas e inactivadas en el tracto digestivo, por lo que no afectan a la microbiota intestinal ni originan problemas de tipo alérgico en los consumidores.
- 20 ▪ Actúan sinérgicamente con otros sistemas de conservación pudiendo contribuir a un menor empleo de ciertos aditivos químicos y/o a la suavización de algunos tratamientos tecnológicos.

El ácido 3-feniláctico es un ácido orgánico formado en el metabolismo de la fenilalanina (Figura 1) en el cual la fenilalanina es transaminada a ácido fenilpirúvico (Mu y col., 2009a). El ácido 3-feniláctico es producido por diversos microorganismos 25 incluyendo algunas bacterias ácido lácticas (Prema y col., 2010; Mu y col., 2009a; Mu y col., 2009b; Ström y col., 2002; Valerio y col., 2004; Li y col., 2007), hongos como *Geotrichum candidum* (Diverleux y col., 1998a) y bacterias ácido propiónicas (Thierry y Maillard, 2002; Schwenninger y col., 2008). El ácido 3-feniláctico es considerado en la actualidad como un novedoso compuesto antimicrobiano con un amplio espectro de 30 inhibición de los principales microorganismos causantes del deterioro de los alimentos frescos o incluso de los principales patógenos presentes en alimentos, como es el caso

de *Listeria monocytogenes* o *Staphylococcus aureus* (Dieuleveux y col., 1998b; Dal Belo y col., 2007). Debido a esta capacidad de inhibición, el ácido 3-feniláctico posee un interesante potencial para la aplicación práctica como agente antimicrobiano en la industria alimentaria (Mu y col., 2009a) abriendo nuevas perspectivas de utilización de este compuesto para el control antimicrobiano pudiendo aumentar así la vida útil de los alimentos (Lavermicocca y col., 2003).

Simultáneamente también se produce ácido láctico, un ácido orgánico ampliamente estudiado y empleado en la actualidad en numerosos sectores industriales tales como en la industria química (en la obtención de polímeros biodegradables), en la industria alimentaria (como agente acidulante y conservante), así como en la industria cosmética y farmacéutica. La producción industrial de ácido láctico viene definida por la coexistencia de los procesos basados en la síntesis química y de los procesos fermentativos. En los últimos años se ha incrementado la producción por procedimientos fermentativos debido, entre otros factores, a la creciente necesidad de producir isómeros puros. La producción de ácido láctico por vía fermentativa con respecto a la química se caracteriza por ser relativamente rápida, transcurrir con elevados rendimientos, permitir el empleo de múltiples materias primas renovables para su producción y poder dar lugar, selectivamente, a uno de los isómeros del ácido láctico.

20

El interés del ácido láctico reside en varios aspectos, entre los que cabe destacar:

- Su elevado valor añadido.
- Es un producto GRAS (Generally Recognized As Safe), es decir, reconocido como inofensivo por la Administración Estadounidense de Alimentación y Drogas (United States Food and Drug Administration) (Hofvendahl y Hähn-Hägerdal, 2000).
- Presenta un mercado perfectamente establecido con gran potencial de crecimiento.
- Posibilidad de producción por vía química y vía fermentativa.

25

- Diversidad de materiales empleados como materias primas en su producción por vía fermentativa.
- Posibilidad de optimización tecnológica del proceso de producción y purificación del producto.

5 A pesar de las ventajas que presentan los productos biotecnológicos, las tecnologías de fermentación para su obtención deben de ser competitivas en costes con la síntesis química, por esto resulta de gran interés la búsqueda de residuos que constituyan una fuente de recursos abundante, barata y renovable a la vez que se reduce el volumen de residuos generados en la actividad industrial. En los procesos
10 fermentativos, el coste del medio de cultivo puede representar un 30% del total (Miller y col., 1986).

 La bioproducción de bacteriocinas y ácido láctico han sido ampliamente estudiadas, incluso empleando diversos materiales residuales. Por el contrario, los
15 estudios existentes en la bioproducción de ácido 3-feniláctico fueron realizados en medios de cultivo caros formulados con nutrientes comerciales tales como los nutrientes MRS (Man Rogosa Sharpe), extracto de levadura y peptona, pero en ningún caso se han empleado residuos o efluentes industriales para su producción. En este contexto, la
20 búsqueda de medios alternativos más baratos, como los que aquí se proponen, tiene un obvio interés económico. Esto sumado a la posibilidad de producir dichos metabolitos simultáneamente por un mismo microorganismo, ofrece una ventaja adicional frente a la producción individual de cada uno de ellos y contribuye a aumentar la rentabilidad del proceso.

25 El extracto de levadura es un concentrado obtenido a partir de la fracción soluble de células de levaduras autolisadas, compuesto por péptidos, aminoácidos, carbohidratos, sales y vitaminas. Dicho extracto se puede utilizar como suplemento nutricional en fermentaciones. Las principales contribuciones del extracto de levadura son las bases púricas y pirimídicas así como las vitaminas del complejo B. Dado que
30 muchos microorganismos tienen limitada capacidad para sintetizar vitaminas del grupo B y aminoácidos, el extracto de levadura se utiliza a menudo para suplir estos factores (Hofvendahl y Hahn-Hagerdal, 2000).

Las proteínas que contienen las levaduras se encuentran dentro de la célula, y generalmente no pueden ser secretadas al medio a no ser que la propia levadura presente enzimas endógenas que induzcan la autólisis. En estos casos se debe recurrir a distintos métodos de rotura celular que permiten la liberación de los componentes intracelulares al medio, con lo que se obtiene una compleja mezcla de péptidos, ácidos nucleicos y fragmentos celulares. La autólisis y el tratamiento térmico moderado son los métodos de ruptura celular más empleados en la obtención de extracto de levadura. Estudios bibliográficos han considerado el empleo de la levadura procedente de los procesos de producción de la cerveza como suplemento para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* en suero (Selmer-Olsen y Soerhaug, 1998) o *Bacillus thuringiensis kurstaki* (Saksinchai y col., 2001). La obtención de ácido láctico utilizando autolisados de levadura como suplemento nutricional ha sido también considerado (Amrane, 2000), por lo que resulta atractiva la hipótesis de emplear las lías procedentes de la fermentación del vino así como el suero lácteo, tras las etapas de acondicionamiento necesarias, como nutrientes económicos en aquellos procesos fermentativos que requieran un coste elevado de nutrientes, con la ventaja adicional de eliminar una fuente de residuos contaminantes, con las consiguientes mejoras competitivas y de imagen de las empresas involucradas.

El proceso que se describe a continuación es de aplicación inmediata a) en la industria alimentaria, ya que el ácido láctico es un aditivo ampliamente empleado dadas sus propiedades antimicrobianas al igual que en el caso de las bacteriocinas y el ácido 3-feniláctico es un novedoso agente antimicrobiano con gran potencial de aplicación por su capacidad de inhibición sobre un amplio espectro de microorganismos; b) de elaboración de productos lácteos, principalmente queserías; y c) en industrias vitivinícolas, ya que se revalorizan dos residuos, suero lácteo y vinazas, respectivamente, cuyos tratamientos suponen elevados costes adicionales para las industrias involucradas, ya que cuando no se gestionan adecuadamente pueden acarrear graves problemas medioambientales. Con ambos residuos se elabora un medio de cultivo económico para la producción biotecnológica de los aditivos alimentarios citados.

Breve explicación de la invención

Frente a las tecnologías llevadas a cabo hasta la fecha para la producción de los metabolitos indicados, en general, mediante bacterias ácido lácticas y dentro de éstas mediante la cepa *Lactobacillus plantarum*, y del ácido 3-feniláctico en particular, y que incluye la adición de costosos nutrientes comerciales, el procedimiento que aquí se propone para su producción biotecnológica implica el empleo de dos residuos industriales, el suero lácteo y las lías de vinificación destiladas, como medio de cultivo para el crecimiento de la cepa anteriormente citada y producción por la misma de los aditivos objeto de la presente invención.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el ácido 3-feniláctico deriva del metabolismo de la fenilalanina por lo que para su producción se hace necesario la búsqueda de residuos proteicos. El suero lácteo resulta adecuado para tal fin, proporcionando adicionalmente la fuente de carbono del proceso, la lactosa, y en menor medida sales minerales. Para incrementar la biodisponibilidad de la fenilalanina fue necesaria una hidrólisis enzimática previa de la fracción proteica del suero. Para la producción de bacteriocinas y ácido láctico la fuente e carbono proporcionada por el suero de queserías (la lactosa), fue adecuada. Por su parte, las lías de vinificación aportan compuestos nitrogenados y sales minerales también necesarios y esenciales para el crecimiento y desarrollo microbiano. Para su empleo, las lías fueron centrifugadas y la fracción líquida de las mismas neutralizada y liofilizada para evitar la dilución de suero lácteo al ser adicionadas.

Tal procedimiento se concreta en:

1. Hidrólisis enzimática del suero.
2. Suplementación del suero hidrolizado con lías de vinificación previamente liofilizadas.
3. Fermentación de la lactosa mediante la bacteria *Lactobacillus plantarum* en presencia de fenilalanina para la producción de ácido 3-feniláctico, ácido láctico y bacteriocinas.

4. Obtención de los extractos antimicrobianos, a partir de los medios exhaustos de fermentación.

5 Explicación detallada de la invención

Producción de extractos antimicrobianos compuestos fundamentalmente por los compuestos antimicrobianos ácido láctico, ácido 3-feniláctico y bacteriocinas, a partir de residuos agroindustriales de forma que transforman el proceso en económicamente competitivo con el obtenido por vía química. Esta invención se basa en la producción biotecnológica de dichos metabolitos antimicrobianos mediante *Lactobacillus plantarum* empleando dos residuos industriales, el suero lácteo y las lías de vinificación destiladas (o vinazas), como nutrientes económicos, tal y como se detalla a continuación:

15

Acondicionamiento de los residuos para su empleo como medio de cultivo y nutrientes económicos.

20 *Hidrólisis enzimática del suero de queserías.*

Esta etapa previa de hidrólisis enzimática de la fracción proteica presente en el suero se hace necesaria para aumentar la biodisponibilidad de la fenilalanina presente, y facilitar así su utilización por los microorganismos implicados (Vermeulen y col., 2006).

25

Para ello se realizaron estudios previos en los que se probaron diversas enzimas proteolíticas a 50 °C y 100 rpm: iZyme (EC 3.4.23.23), Alcalase (EC 3.4.21.62) y Flavourzyme (EC 3.4.11.1), en hidrólisis llevadas a cabo tras 1 ó 12 h de incubación.

30

Suplementación del suero con lías de vinificación destiladas o vinazas.

Para su uso, las vinazas se centrifugaron previamente y la fracción líquida de las mismas se neutralizó con hidróxido sódico hasta pH 7. Una vez neutralizadas se

congelaron y posteriormente se liofilizaron. La fracción sólida de las mismas se guardó a temperatura de refrigeración hasta su posterior empleo.

5 Diferentes volúmenes de vinazas liofilizadas (25, 50, 75 ó 100 mL) se resuspendieron en 100 mL de suero previamente hidrolizado, según el caso a estudiar y se añadió 30 g/L de carbonato cálcico para neutralizar los ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido 3-feniláctico, principalmente) formados durante el proceso fermentativo.

Bioconversión a los metabolitos antimicrobianos de interés alimentario

10

Microorganismo.

Se empleó la cepa bacteriana *Lactobacillus plantarum* CECT-221, suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España).

15

Medio de conservación, de cultivo y proceso fermentativo.

La cepa se conservó en crioviales a -80 °C en el medio comercial MRS (Man Rogosa Sharpe) con glicerol al 15%. La composición de dicho medio es la que se
20 detalla (g/L): peptona (10), extracto de carne (8), extracto de levadura (4), D-glucosa (20), K₂HPO₄ (2), diamonio hidrógeno citrato (2), CH₃COONa (5), MgSO₄·7H₂O (0,2), MnSO₄·2H₂O (0,05) y Tween-80 (1).

El inóculo se preparó creciendo dicha cepa en el mismo medio líquido descrito
25 anteriormente en Erlenmeyers de 250 mL con 100 mL de volumen final de medio a 31,5 °C y 100 rpm de agitación durante 12 h.

Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de volumen final de medio en agitadores orbitales (Innova 4000, New Brunswick
30 Scientific) o en fermentador de 2 L (Braun Biostat) con 1800 mL de volumen final a 31,5 °C y 100 rpm, compuesto por suero lácteo previamente hidrolizado (100 ó 1800 mL, respectivamente) como fuente de carbono, fenilalanina y en menor medida sales minerales, y lías destiladas liofilizadas en distintas concentraciones como fuente nitrogenada así como de sales minerales, o bien los nutrientes comerciales (g/L)

Peptona (15), Extracto de levadura (5), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2), $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ (0,04) propuestos por Graziela y col., (2010). A cada matraz se añadió $CaCO_3$ (30 g/L) para neutralizar el ácido láctico formado durante el proceso fermentativo manteniendo así constante el pH del medio. Todos los medios y materiales empleados fueron esterilizados a 101°C durante 60 minutos en autoclave (RAYPA, Sterilclav 75).

Posteriormente los medios fueron inoculados con un 10% del volumen final de fermentación conteniendo la cepa previamente reactivada y crecida para alcanzar una concentración de biomasa de 2 g/L.

10

La fermentación se consideró finalizada cuando se consumió toda la fuente de carbono presente en el medio (lactosa) y la producción de los ácidos láctico y 3-feniláctico se detuvo.

15 *Toma de muestra y análisis.*

Se tomaron en condiciones asépticas, y a tiempos seleccionados, diversas muestras del medio para hacer un seguimiento de la cinética de fermentación y determinación de los diferentes parámetros fermentativos así como cuantificación de los metabolitos producidos tal y como se describe en el apartado de métodos de análisis.

20

Métodos de análisis.

Para la determinación de la composición de suero y lías, los sólidos totales en suspensión se determinaron por el método de peso seco mediante secado a 105 °C en horno hasta alcanzar peso constante. El contenido en cenizas se determinó por secado en mufla hasta alcanzar peso constante a 550 °C. Para determinar el contenido en carbón y nitrógeno se empleó un Analizador Térmico Elemental Finnigan modelo 1112 (Thermo Finningan, San José, CA, USA). Las cenizas se emplearon para determinar metales (Cu, Mg, Fe, Mn, Ca, Al y Zn) empleando un Espectrofotómetro de Absorción Atómica modelo 220 Fast Sequential (Varian, Palo Alto, CA). Para este propósito, 0,15 g de cenizas se digirieron previamente con 5 mL HNO_3 65% (w/w), 1 mL de H_2O_2 30% (w/w) y 0,5 mL de HF 40% (w/w) en un Microondas Labstation mls 1200 mega (Milestone, Bergamo, Italia).

30

Los compuestos solubles (azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos) se determinaron mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE). Para emplear este tipo de análisis, las diferentes muestras tomadas se centrifugaron previamente a
5 4500 rpm durante 15 minutos y los sobrenadantes se filtraron a través de una membrana (*Sartorius*) de 0,22 μm de tamaño de poro, mientras que el precipitado se usó para la determinación de biomasa mediante el proceso de peso seco descrito anteriormente. La cuantificación de los compuestos a determinar se realizó en base a estándares de concentración conocida de los mismos, analizados simultáneamente a las muestras.

10

La lactosa, glucosa, ácido láctico, ácido acético se determinaron empleando un cromatógrafo líquido de alta eficacia Agilent 1200 equipado con detector de índice de refracción y una columna cromatográfica de intercambio iónico Aminex HPX-87H (Bio Rad 300 x 7,8 mm, 9 μ), termostatada. El régimen de elución fue isocrático con un
15 caudal de 0,6 mL/min de H_2SO_4 0,003M a 50°C. Para la determinación del ácido 3-feniláctico producido también se empleó un cromatógrafo líquido de alta eficacia Agilent 1200 pero en este caso equipado con detector UV y una columna cromatográfica C-18 Zorbax SB-Aq (Agilent 4,6 x 150 mm, 5 μ), termostatada, empleando un régimen de elución en gradiente con metanol/0,05% ácido
20 trifluoroacético (solvente A) y agua/0,05% ácido trifluoroacético (solvente B) a 1 mL/min y A/B ratios de 10:90, 100:0, 100:0, y 10:90, a 0, 20, 23 y 25 min, respectivamente. El ácido 3-feniláctico se determinó a 210 nm (Li y col., 2007).

Extracción de bacteriocinas

25

Para la extracción de las bacteriocinas, asociadas a la pared celular de la biomasa, el medio de fermentación, conteniendo los ácidos orgánicos producidos y la biomasa, se ajustó a pH 3,5 adicionando HCl 5N y se calentó a baño maría (100 °C) durante 3 minutos (Cabo y col., 1999). Transcurrido este tiempo se centrifugó el medio
30 (4500 rpm, 15 min, 10°C) para obtener los extractos antimicrobianos libres de células.

Análisis de actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos

Para su determinación se siguió el método de difusión en agar (Tagg y Mcgiven, 1971) empleando como microorganismos indicadores el *Carnobacterium maltaromaticum*, CECT- 4020, el microorganismo empleado por excelencia en la determinación de la actividad de las bacteriocinas y como microorganismos patógenos indicadores los siguientes: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT-724, *Pseudomonas aeruginosa* CECT-116, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CECT-239 y *Listeria monocytogenes* CECT-934, todas ellas obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España).

De este modo, el procediendo seguido es el que se indica a continuación:

El medio de cultivo MRS con agar al 20%, tras esterilización y mantenido en forma líquida a 45 °C, se dispensa en placas petri (aproximadamente 25 mL/placa del medio MRS-agar) y se inocula con 100 µL del cultivo del microorganismo indicador de 12 h de edad, agitando inmediata y suavemente la placa para que la bacteria se distribuya uniformemente en el agar y se deja solidificar. A continuación se abren pocillos (por ejemplo, con ayuda de la boca ancha de una pipeta Pasteur estéril conectada a una bomba de vacío) en los cuales se disponen 50 µL del extracto antimicrobiano a analizar. Seguidamente, y con el fin de facilitar la difusión de los extractos en el agar, se colocan las placas a 4 °C durante 2 horas siendo posteriormente incubas a la temperatura óptima de crecimiento de cada uno de los microorganismos indicadores (30°C en el caso del *Carnobacterium* y 37°C en el resto de microorganismos) hasta que el crecimiento de la cepa indicadora permitiera la visión de los halos de inhibición. Finalmente se miden los diámetros de los halos de inhibición.

Todos los experimentos y medidas se realizaron por duplicado. Los datos experimentales recogidos en la presente memoria representan la media de los mismos, con desviaciones menores al 5%.

A continuación se citan algunos artículos relacionados:

Amrane, A. (2000). Evaluation of lactic acid bacteria autolysate for the supplementation of lactic acid bacteria fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16(2), 207-209.

- Beltrán, F. J., García-Araya, J. F. y Álvarez, P. M. (1999). Wine distillery wastewater degradation. 1. Oxidative treatment using ozone and its effect on the wastewater biodegradability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 3911-3918.
- Brinques, G.B., Do Carmo Peralba, M., Ayub, M.A.Z. (2010). Optimization of probiotic and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* in submerged bioreactor systems. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 37 (2), pp. 205-212.
- Cabo, M.L., Murado, M.A., González, M.P. y Pastoriza, L. (1999). A method for bacteriocin quantification. *Journal of Applied Microbiology* 87, 907-914.
- Dal Belo, F., Clarke, C.I., Ryan, L.A.M., Ulmer, H., Schober, T.J., Strom, K., Sjogren, J., van Sinderen, D., Schnurer, J., Arendt, E.K. (2007). Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *Journal of Cereal Science*. 45, 309-318.
- Dieuleveux, V., & Gueguen, M. (1998b). Antimicrobial effects of D-3-phenyllactic acid on *Listeria monocytogenes* in TSB-YE medium, milk, and cheese. *Journal of Food Protection* 61, 1281-1285.
- Dieuleveux, V., Van Der Pyl, D., Chataud, J., & Gueguen, M. (1998a). Purification and characterization of anti-*Listeria* compounds produced by *Geotrichum candidum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 800-803.
- Hofvendahl, K., Hähn-Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 87-107.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., & Visconti, A. (2003). Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 634-640.
- Li, X., Jiang, B., & Pan, B. (2007). Biotransformation of phenylpyruvic acid to phenyllactic acid by growing and resting cells of a *Lactobacillus* sp. *Biotechnology Letters*, 29(4), 593-597.
- Miller, T.L., Churchill, B.W. (1986). Substrates for large-scale fermentations. En: "Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology". Demain, A.; Solomon, LA, Ed. American Society for Microbiology: Washington DC.
- Mu, W., Chen, C., Li, X., Zhang, T., & Jiang, B. (2009b). Optimization of culture medium for the production of phenyllactic acid by *Lactobacillus* sp. SK007. *Bioresource Technology* 100, 1366-1370.

- Mu, W., Liu, F., Jia, J., Chen, C., Zhang, T., & Jiang, B. (2009a). 3-Phenyllactic acid production by substrate feeding and pH-control in fed-batch fermentation of *Lactobacillus* sp. SK007. *Bioresource Technology*, *100*, 5226–5229.
- 5 Prema, P., Smila, D., Palavesam, A., & Immanuel, G. (2010). Production and characterization of an antifungal compound (3-phenyllactic acid) produced by *Lactobacillus plantarum* strain. *Food and Bioprocess Technology*, *3*, 379–386.
- Saksinchai, S., Supphantharika, M. y Verduyn, C. (2001). Application of a simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki: A physiological study. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* *17*(3), 307-316.
- 10 Schwenninger, S. M., Lacroix, C., Truttmann, S., Jans, C., Spörndli, C., Bigler, L., & Meile, L. (2008). Characterization of low-molecular-weight antiyeast metabolites produced by a food-protective *Lactobacillus–Propionibacterium* coculture. *Journal of Food Protection*, *71*, 2481–2487.
- 15 Selmer-Olsen, E. y Soerhaug, T. (1998). Comparative studies of the growth of *Lactobacillus plantarum* in whey supplemented with autolyzate from brewery yeast biomass or commercial yeast extract. *Milchwissenschaft*. *53*(7), 367-370.
- Ström, K., Sjogren, J., Broberg, A., & Schnurer, J. (2002). *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (LPhe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*, 4322–4327.
- 20 Tagg, JR., y McGiven, R. (1971). Assay system for bacteriocins. *Applied Microbiology* *21*(5): 943
- Thierry, A., y Maillard, M. B. (2002). Production of cheese flavour compounds derived from amino acid catabolism by *Propionibacterium freudenreichii*. *Lait*, *82*, 17–32.
- 25 Valerio, F., Lavermicocca, P., Pascale, M., & Visconti, A. (2004). Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: An approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *Fems Microbiology Letters*, *233*(2), 289-295.
- 30 Vermeulen, N., Gánzel, M. G., & Vogel, R.F. (2006). Influence of peptide supply and cosubstrates on phenylalanine metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451T and *Lactobacillus plantarum* TMW1.468. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 3832-3839.

Ejemplos de realización de la invención

Los Ejemplos 1, 2 y 3 detallan tres posibles modos de realización del proceso descrito permitiendo el escalado del mismo y el Ejemplo 4 muestra la aplicación de los extractos antimicrobianos obtenidos frente a diferentes cepas bacterianas, algunas de ellas patógenas.

Ejemplo 1. Producción discontinua de extractos antimicrobianos en Erlenmeyer

En este primer ejemplo se muestra el resultado de la producción simultánea y conjunta de los compuestos antimicrobianos ácido láctico, ácido 3-feniláctico y bacteriocinas en frascos Erlenmeyer, empleando la bacteria *Lactobacillus plantarum* como microorganismo, suero lácteo como fuente de lactosa y fenilalanina, y vinazas como fuente de nitrógeno y sales minerales. Las proteínas contenidas en el suero lácteo se hidrolizaron con Flavourzyme (EC 3.4.11.1) a 50 °C, 12 h y 100 rpm para liberar la fenilalanina. Los hidrolizados obtenidos (100 mL de volumen final) se suplementaron con 25, 50, 75 ó 100 mL de lías liofilizadas, o bien 50 mL de lías liofilizadas y 20 g/L de lías sólidas. Las fermentaciones se llevaron a cabo en frascos Erlenmeyers de 250 mL de capacidad a 31,5 °C y 100 rpm en un incubador orbital (Innova 4000, New Brunswick Scientific) en cultivos discontinuos. Con fines comparativos (control positivo), se llevó a cabo una fermentación empleando la lactosa del suero como fuente de carbono suplementada con los nutrientes comerciales propuestos por Graziela y col., (2010): Peptona (15 g/L), Extracto de levadura (5 g/L), MgSO₄·7H₂O (0,2 g/L), MnSO₄·2H₂O (0,04 g/L).

25

Los resultados de tal proceder en cuanto al consumo de fenilalanina y lactosa, generación de ácidos feniláctico y láctico respectivamente, así como los parámetros de la fermentación se recogen en la Tabla 2. En todos los casos se logran valores de ácido 3-feniláctico que oscilan entre 1,17 y 1,55 mM, productividades globales volumétricas (Q_{AFL}) entre 0,014 y 0,019 g/L·h, velocidad de consumo de fenilalanina (Q_{Phe}) entre 0,003 y 0,006 g/L·h, y rendimientos en producto ($Y_{AFL/Phe}$) entre 0,51 y 0,71 g/g.

30

Al emplear lías de vinificación destiladas, o vinazas, la conversión más eficaz de fenilalanina y lactosa en ácidos 3-feniláctico y láctico respectivamente, se logra al

emplear conjuntamente las fracciones sólida (20 g/L) y líquidas (50 mL) de lías como nutrientes (apartado e de la Tabla 2). En este caso, la concentración final de ácido 3-feniláctico asciende a 1.25 mM, correspondiéndole una productividad global volumétrica (Q_{AFL}) de 0,016 g/L·h y un rendimiento en producto ($Y_{AFL/Phe}$) de 0,59 g/g.

5

Al reemplazar las lías como nutrientes, por nutrientes comerciales más costos (control en Tabla 2), se alcanzan 1.55 mM de ácido 3-feniláctico, con una productividad global volumétrica (Q_{AFL}) de 0,019 g/L·h y un rendimiento en producto ($Y_{AFL/Phe}$) de 0,51 g/g.

10

Contrariamente, la producción de ácido láctico fue ligeramente superior en las fermentaciones llevadas a cabo únicamente con lías líquidas, seguido por nutrientes comerciales y lías con ambas fracciones. Las concentraciones de ácido láctico se sitúan entre los 29,4 y los 35,7 g/L, con productividades globales volumétricas (Q_{AL}) entre 0,38 y 0,45 g/L·h, velocidad de consumo de lactosa ($Q_{Lactosa}$) entre 0,47 y 0,54 g/L·h, y rendimientos en producto ($Y_{AL/Lactosa}$) entre 0,77 y 0,93 g/g.

15

Ejemplo 2. Producción discontinua de extractos antimicrobianos en fermentador de 2L

20

Se realizó este ensayo para escalar el proceso desarrollado en el Ejemplo 1 desde frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidad a un fermentador Braun Biostat de 2 L de capacidad.

25

La biotransformación de fenilalanina en ácido 3-feniláctico y de lactosa en ácido láctico fue desarrollada en fermentador Braun Biostat de 2 L de capacidad conteniendo 1800 mL de volumen final de medio de cultivo. El proceso se desarrolló a 31,5 °C y 100 rpm y pH controlado y ajustado automáticamente a 6,2 con hidróxido sódico 5N (NaOH), empleando la bacteria *Lactobacillus plantarum* como microorganismo, el suero lácteo como fuente de fenilalanina y lactosa tras hidrólisis con Flavourzyme (EC 3.4.11.1) a 50 °C, 12 h y 100 rpm, y los nutrientes comerciales propuestos por Graziela y col., (2010) como fuente de sales minerales.

30

Los resultados de tal proceder se muestran en la Figura 3 expresados en función de la evolución a lo largo del tiempo del consumo de fenilalanina y lactosa y la generación de ácidos 3-feniláctico y láctico, respectivamente. La Tabla 3 muestra los parámetros de la fermentación de la misma.

5

La solución de biotransformación alcanzó un contenido de ácido 3-feniláctico de 1,3 mM tras 56 h de fermentación y 0,64 g/L de fenilalanina residual, correspondiéndole una productividad global volumétrica (Q_{AFL}) de 0,019 g/L·h, valor idéntico al alcanzado en el apartado a) del Ejemplo 1 con similares nutrientes pero con menor volumen de trabajo. El rendimiento de biotransformación fue del 57 % ($Y_{AFL/Phe} = 0,59$ g/g). El contenido de ácido láctico ascendió a 48,4 g/L y la lactosa residual de 0,44 g/L correspondientes a una productividad global volumétrica (Q_{AL}) de 0,7 g/L·h, valor que duplica al alcanzado en el apartado a) del Ejemplo 1. El rendimiento en producto ($Y_{AL/Lactosa}$) alcanzado de este tipo de biorreactor se sitúa en 1,24 g/g.

15

Ejemplo 3. Producción en continuo de extractos antimicrobianos en fermentador.

Se realizó este ensayo en fermentador Braun Biostat de 2 L de capacidad para ampliar la modalidad de fermentación, de un proceso discontinuo desarrollado en el Ejemplo 2 a una modalidad de fermentación en continuo.

20

La biotransformación de fenilalanina en ácido 3-feniláctico y de lactosa en ácido láctico fue desarrollada por procesos en continuo empleando un fermentador Braun Biostat de 2 L de capacidad conteniendo 1800 mL de volumen final de medio de cultivo. El proceso se desarrolló a 31,5 °C y 100 rpm y pH controlado y ajustado automáticamente a 6,2 con hidróxido sódico 5N (NaOH), empleando la bacteria *Lactobacillus plantarum* como microorganismo, el suero lácteo como fuente de fenilalanina y lactosa tras hidrólisis con Flavourzyme (EC 3.4.11.1) a 50 °C, 12 h y 100 rpm, y los nutrientes comerciales propuestos por Graziela y col., (2010) como fuente de sales minerales. La fermentación se llevó a cabo en un rango de caudales de 0,17 a 1,18 mL/min.

30

Los resultados de tal proceder así como los parámetros de la fermentación se recogen en la Tabla 4 y la Figura 4. La solución de biotransformación alcanzó

concentraciones de ácido 3-feniláctico en el intervalo de 0,64 a 0,91 mM, correspondiéndole una productividad global volumétrica (Q_{AFL}) de 0,001 a 0,005 g/L·h, velocidad de consumo de fenilalanina (Q_{Phe}) de 0,002 a 0,02 g/L·h, y rendimiento en producto ($Y_{AFL/Phe}$) de 0,29 a 0,48 g/g. El contenido de ácido láctico se situó entre los
 5 32,8 y los 39,7 g/L, correspondientes a una productividad global volumétrica (Q_{AL}) de 0,23 a 1,35 g/L·h, velocidad de consumo de lactosa ($Q_{Lactosa}$) de 0,27 a 1,86 g/L·h, y rendimiento en producto ($Y_{AL/Lactosa}$) de 0,73 a 0,88 g/g.

**Ejemplo 4. Aplicación de los extractos antimicrobianos obtenidos frente a diversas
 10 bacterias patógenas.**

Se realizó este ensayo para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos como se indicó anteriormente. De este modo, una vez liberadas las bacteriocinas al medio de fermentación obtenemos un extracto antimicrobiano, según
 15 metodología descrita previamente, constituido principalmente por ácido láctico, ácido feniláctico y bacteriocinas. Dichos extractos fueron probados como antimicrobianos frente al crecimiento y desarrollo de las cepas bacterianas *Carnobacterium maltaromaticum*, CECT- 4020, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT-724, *Pseudomonas aeruginosa* CECT-116, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CECT-239
 20 y *Listeria monocytogenes* CECT-934.

Como podemos observar en la Figura 5 el extracto antimicrobiano obtenido produce un halo de inhibición mucho mayor que el que produce cualquiera de las disoluciones comerciales, y en la misma concentración, de los compuestos antimicrobianos producidos mediante los procesos de bioconversión que se pretende
 25 reivindicar con el presente trabajo.

La Figura 6 muestra una comparación de los diámetros de los halos de inhibición en mm producidos por el extracto antimicrobiano obtenido frente a las diversas cepas bacterianas patógenas empleadas en el estudio. Como se puede observar en la Figura, la inhibición es de mayor a menor efecto en; *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (9,03
 30 mm) seguido de *Pseudomonas aeruginosa* (8,78 mm), *Listeria monocytogenes* (7,38 mm) y por último con el menor halo de inhibición, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (6,63 mm).

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la producción de extractos antimicrobianos a partir de suero lácteo y lías de vinificación (o vinazas) como suplemento nutricional que se caracteriza por comprender las siguientes etapas:
5
a) Hidrólisis de las proteínas del suero lácteo con enzimas proteolíticas a 50 °C y 100 rpm, llevada a cabo entre 1 y 12 h de incubación.
b) Aporte nutricional al suero hidrolizado con lías de vinificación destiladas
c) Fermentación por medio de bacterias ácido lácticas en incubador orbital a
10 31,5 °C y 100 rpm.
2. Proceso para la producción de extractos antimicrobianos a partir de suero lácteo y lías de vinificación como suplemento nutricional, según reivindicación 1, en el que las enzimas proteolíticas empleadas en la etapa a) son iZyme (EC 3.4.23.23) o Alcalase (EC 3.4.21.62) o Flavourzyme (EC 3.4.11.1)
- 15 3. Proceso para la producción de extractos antimicrobianos a partir de suero lácteo y lías de vinificación como suplemento nutricional, según reivindicación 1, en el que las vinazas se centrifugaron previamente y la fracción líquida se neutralizó a pH 7. Una vez neutralizadas se congelaron y se liofilizaron. Las vinazas liofilizadas se resuspendieron en el suero hidrolizado en la etapa a).
- 20 4. Proceso para la producción de extractos antimicrobianos a partir de suero lácteo y lías de vinificación como suplemento nutricional, según reivindicación 1, en el que en la etapa b) se utilizan lías de vinificación liofilizadas o mezcla de lías liofilizadas y sólidas rehidratadas en el medio anterior,
5. Proceso para la producción de extractos antimicrobianos a partir de suero lácteo y lías de vinificación como suplemento nutricional, según reivindicación 1, en el que la bacteria ácido láctica empleada en la fermentación es la cepa
25 *Lactobacillus plantarum*.
6. Proceso para la producción de extractos antimicrobianos a partir de suero lácteo y lías de vinificación como suplemento nutricional en continuo caracterizado por utilizar un fermentador en un rango de caudales entre 0,17 a 1,18 mL/min a 31,5
30 °C de temperatura y 100 rpm de agitación.
7. Proceso para la producción de extractos antimicrobianos a partir de suero lácteo y lías de vinificación como suplemento nutricional, según reivindicaciones 1 a 6

caracterizado porque la solución resultante contiene una mezcla de ácido feniláctico (entre 0,64 y 1,55 mM) y ácido láctico (entre 30,1 y 48,4 g/L).

- 5
8. El empleo del extracto antimicrobiano obtenido según el proceso de producción indicado, a partir de suero lácteo y suplementos nutricionales, según reivindicaciones 1 a 6, en la industria alimentaria.

Tabla 1. Composición química del suero lácteo empleado (pH 6,5).

Constituyentes	Concentración
Sólidos totales (g/L)	63,5
Lactosa (g/L)	50,4
Ácido láctico (g/L)	0,95
Proteína (g/L)	9,6
Grasa (g/L)	3,71
Cu (mg/Kg)	<1,8
Zn (mg/Kg)	<1,0
Fe (mg/Kg)	<6,0
Mn (mg/Kg)	<1,2
Ca (mg/Kg)	292
Mg (mg/Kg)	79,2
Na (mg/Kg)	456
K (g/Kg)	1,6
Al (mg/Kg)	<30

Figura 1. Metabolismo de la fenilalanina en bacterias ácido lácticas (Vermeulen y col., 2006).

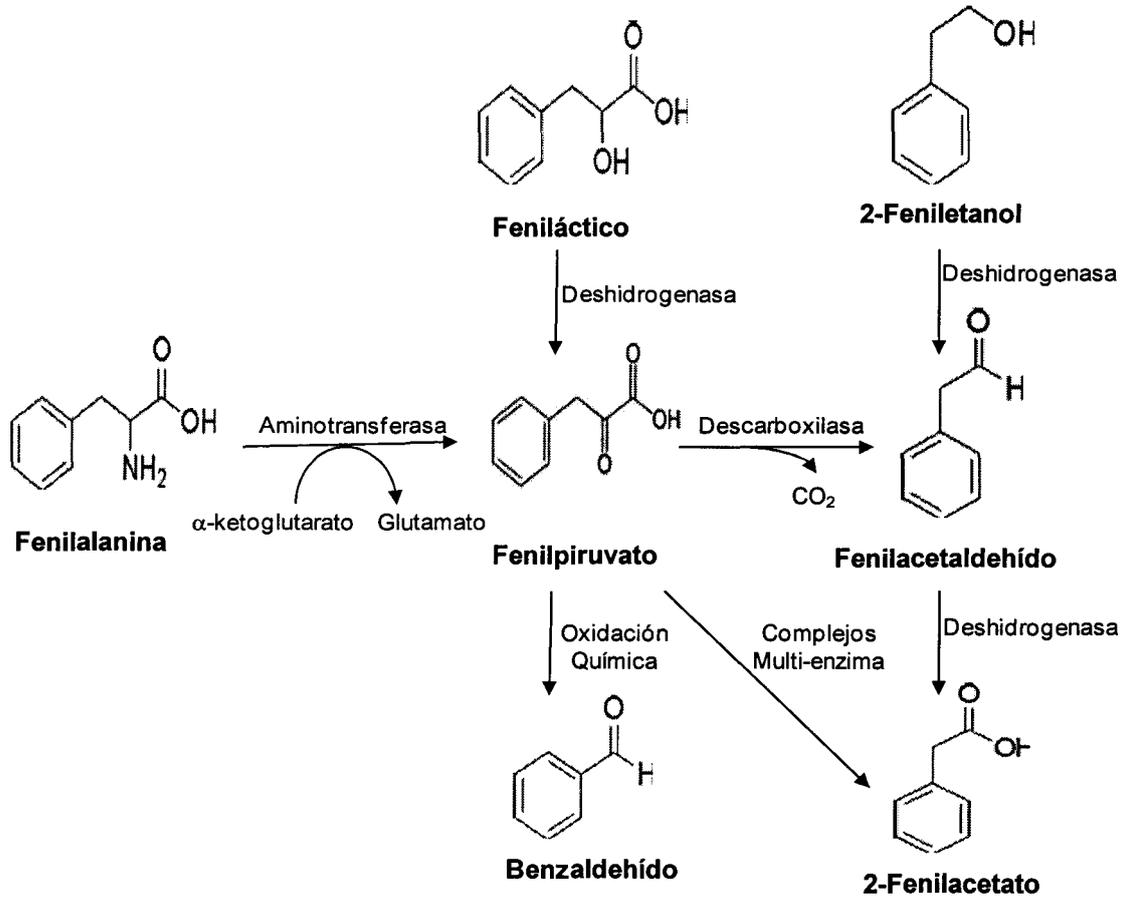


Tabla 2. Parámetros de fermentación en Ejemplo 1 a tiempo cero y tras 80 h de fermentación, durante la conversión de fenilalanina en ácido 3-feniláctico y lactosa en ácido láctico empleando la cepa *Lactobacillus plantarum*, suero lácteo como fuente de lactosa y fenilalanina, y vinazas o nutrientes comerciales como suplemento nutricional.

	Control	a)	b)	c)	d)	e)
Fenilalanina inicial (g/L)	1,2	0,47	0,53	0,52	0,53	0,5
Fenilalanina final (g/L)	0,67	0,16	0,17	0,22	0,25	0,15
Ácido 3-feniláctico (mM)	1,55	1,19	1,18	1,17	1,19	1,25
Q_{AFL} (g/L·h)	0,019	0,015	0,015	0,015	0,014	0,016
Q_{Phe} (g/L·h)	0,006	0,004	0,005	0,004	0,003	0,004
$Y_{AFL/Phe}$ (g/g)	0,51	0,64	0,54	0,64	0,71	0,59
Lactosa inicial (g/L)	43,7	39,6	38,7	40,2	39,5	39,1
Lactosa final (g/L)	0,46	0,55	0,7	1,01	1,15	0,97
Ác. láctico producido (g/L)	30,1	33,1	31,9	32,1	35,7	29,4
Q_{AL} (g/L·h)	0,38	0,41	0,40	0,40	0,45	0,38
$Q_{Lactosa}$ (g/L·h)	0,54	0,49	0,47	0,49	0,48	0,48
$Y_{AL/Lactosa}$ (g/g)	0,70	0,85	0,84	0,82	0,93	0,77

a) 25 mL de lías liofilizadas; b) 50 mL de lías liofilizadas; c) 75 mL de lías liofilizadas; d) 100 mL de lías liofilizadas; e) 50 mL de lías liofilizadas y 20 g/L de lías sólidas. Q_{AFL} : velocidad global volumétrica de ácido 3-feniláctico; Q_{Phe} : velocidad de consumo de fenilalanina; $Y_{AFL/Phe}$: rendimiento de fenilalanina en ácido 3-feniláctico; Q_{AL} : velocidad global volumétrica de ácido láctico; $Q_{Lactosa}$: velocidad de consumo de lactosa; $Y_{AL/Lactosa}$: rendimiento de lactosa en ácido láctico.

Figura 2. Cinéticas de fermentación en Ejemplo 1 de las diferentes condiciones ensayadas en Erlenmeyer: Control; a) 25 mL de lías liofilizadas; b) 50 mL de lías liofilizadas; c) 75 mL de lías liofilizadas; d) 100 mL de lías liofilizadas; e) 50 mL de lías liofilizadas y 20 g/L de lías sólidas. Lactosa (♦), ácido láctico (■), fenilalanina (●), ácido 3-feniláctico (*).

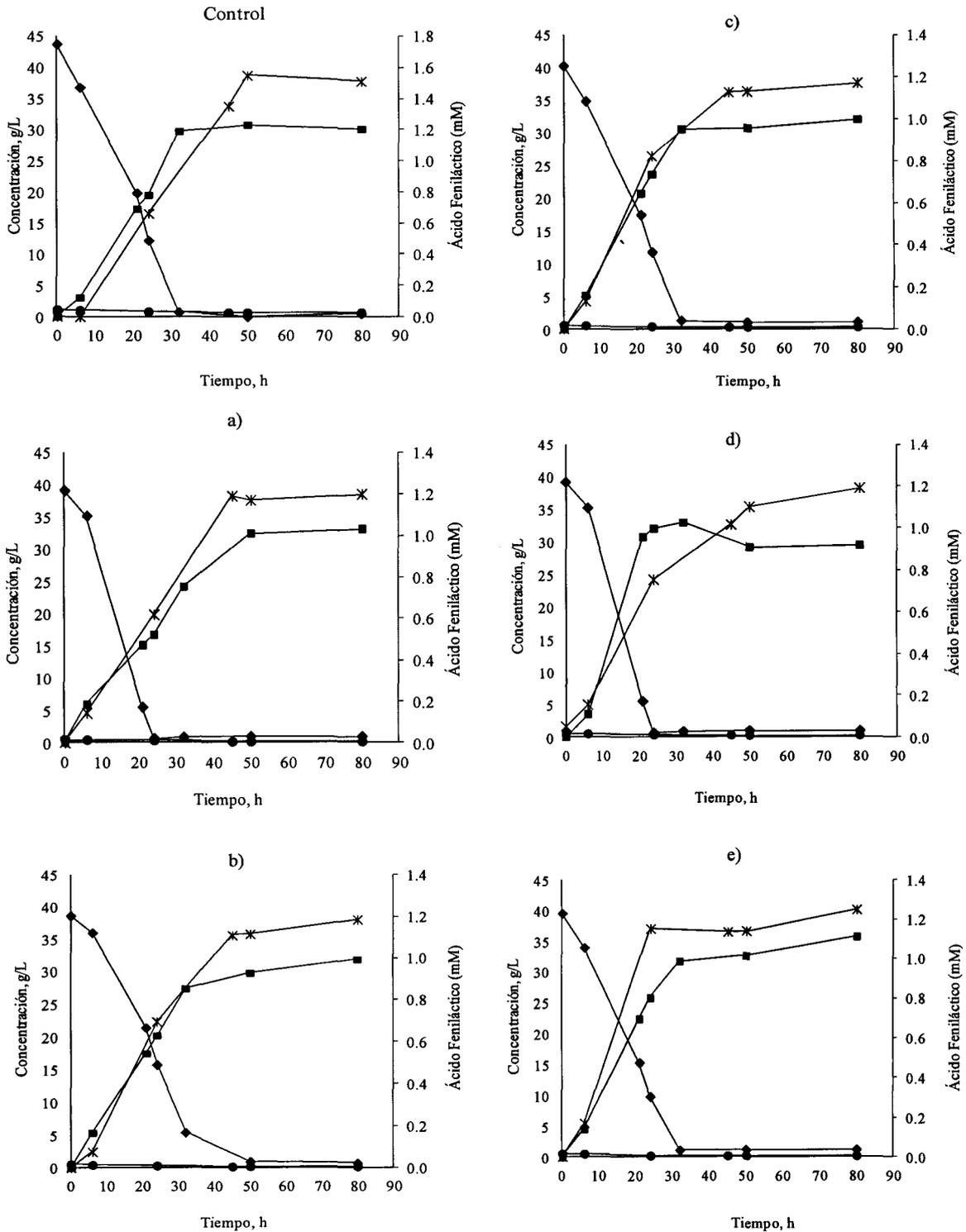


Tabla 3. Parámetros de fermentación en Ejemplo 2 a tiempo cero y tras 56 h de fermentación, durante la conversión de fenilalanina en ácido 3-feniláctico y lactosa en ácido láctico empleando la cepa *Lactobacillus plantarum*, suero lácteo como fuente de lactosa y fenilalanina y nutrientes comerciales como suplemento nutricional en fermentador de 2 L.

	Fermentador 2 L
Fenilalanina inicial (g/L)	1,0
Fenilalanina final (g/L)	0,64
Ácido 3-feniláctico (mM)	1,3
Q_{AFL} (g/L·h)	0,019
Q_{Phe} (g/L·h)	0,007
$Y_{AFL/Phe}$ (g/g)	0,57
Lactosa inicial (g/L)	39,6
Lactosa final (g/L)	0,44
Ác. láctico producido (g/L)	48,4
Q_{AL} (g/L·h)	0,7
$Q_{Lactosa}$ (g/L·h)	0,86
$Y_{AL/Lactosa}$ (g/g)	1,24

Q_{AFL} : velocidad global volumétrica de ácido 3-feniláctico; Q_{Phe} : velocidad de consumo de fenilalanina; $Y_{AFL/Phe}$: rendimiento de fenilalanina en ácido 3-feniláctico; Q_{AL} : velocidad global volumétrica de ácido láctico; $Q_{Lactosa}$: velocidad de consumo de lactosa; $Y_{AL/Lactosa}$: rendimiento de lactosa en ácido láctico.

Figura 3. Cinética de bioconversión en Ejemplo 2 en fermentador discontinuo. Lactosa (◆), ácido láctico (●), fenilalanina (■), ácido 3-feniláctico (▲).

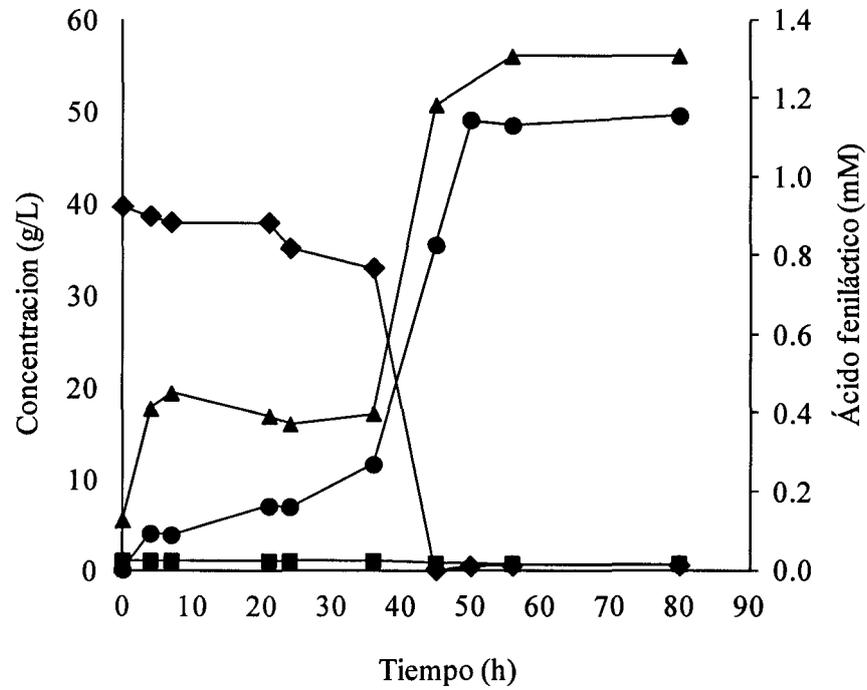


Tabla 4. Parámetros de fermentación en Ejemplo 3, durante la fermentación en continuo de fenilalanina en ácido 3-feniláctico y lactosa en ácido láctico empleando la cepa *Lactobacillus plantarum*, suero lácteo como fuente de lactosa y fenilalanina y nutrientes comerciales como suplemento nutricional en fermentador de 2 L bajo distintos caudales: a) 0,17 mL/min; b) 0,62 mL/min y c) 1,18 mL/min.

	a)	b)	c)
Fenilalanina inicial (g/L)	0,47	0,36	0,32
Fenilalanina final (g/L)	0,32	0,37	0,36
Ácido 3-feniláctico (mM)	0,91	0,81	0,64
Q_{AFL} (g/L·h)	0,001	0,003	0,005
Q_{Phe} (g/L·h)	0,002	0,008	0,02
$Y_{AFL/Phe}$ (g/g)	0,48	0,36	0,29
Lactosa inicial (g/L)	45,1	0	0
Lactosa final (g/L)	0	0	0
Ác. láctico producido (g/L)	38,4	32,8	39,7
Q_{AL} (g/L·h)	0,23	0,93	1,35
$Q_{Lactosa}$ (g/L·h)	0,27	1,06	1,86
$Y_{AL/Lactosa}$ (g/g)	0,85	0,88	0,73

Q_{AFL} : velocidad global volumétrica de ácido 3-feniláctico; Q_{Phe} : velocidad de consumo de fenilalanina; $Y_{AFL/Phe}$: rendimiento de fenilalanina en ácido 3-feniláctico; Q_{AL} : velocidad global volumétrica de ácido láctico; $Q_{Lactosa}$: velocidad de consumo de lactosa; $Y_{AL/Lactosa}$: rendimiento de lactosa en ácido láctico.

Figura 4. Datos de la producción en Ejemplo 3 de **a)** ácido 3-feniláctico; AFL (\blacklozenge), velocidad de consumo de fenilalanina; Q_{Phe} , (\blacktriangle), velocidad global volumétrica de ácido feniláctico; Q_{AFL} (\blacksquare) y rendimiento de fenilalanina en ácido feniláctico; $Y_{AFL/Phe}$ (\times), así como **b)** producción de ácido láctico; AL (\blacklozenge), velocidad global volumétrica de ácido láctico; Q_{AL} (\blacksquare), velocidad de consumo de lactosa; $Q_{Lactosa}$ (\blacktriangle), rendimiento de lactosa en ácido láctico; $Y_{AL/Lactosa}$ (\times), referentes al estado estacionario obtenido a los diferentes caudales ensayados en la fermentación en continuo del Ejemplo 3.

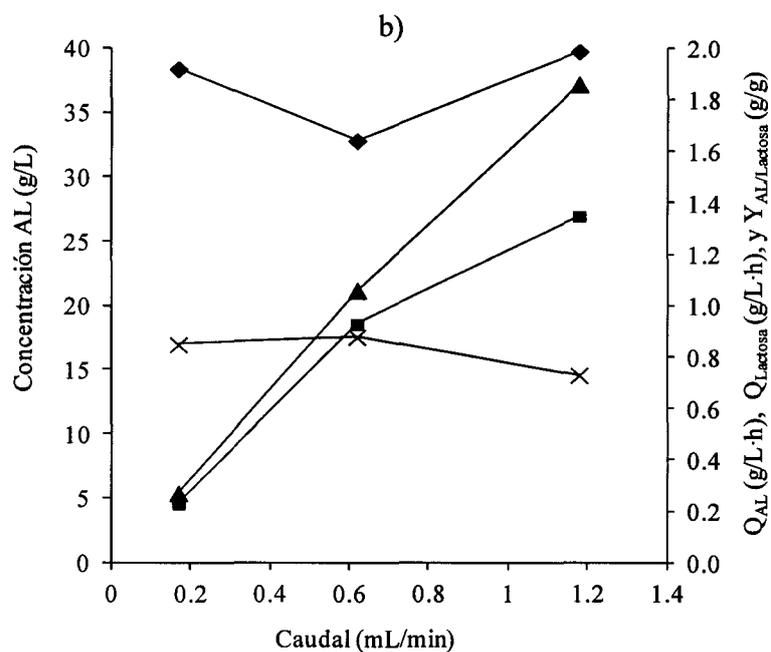
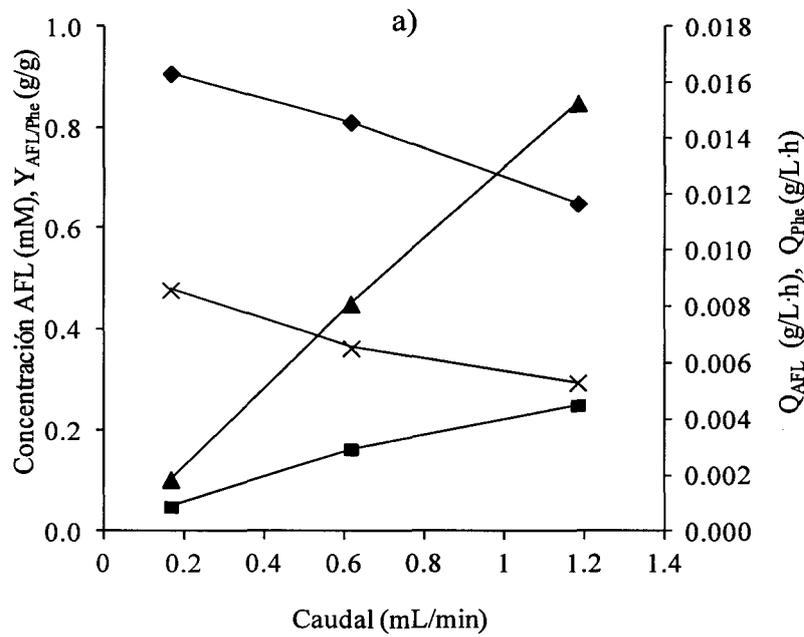


Figura 5. Diámetro de los halos de inhibición en mm producidos por el extracto antimicrobiano obtenido, así como de disoluciones comerciales de ácido láctico (AL) y ácido feniláctico (AFL) y Nisina, empleando como microorganismo indicador *Carnobacterium maltaromaticum*.

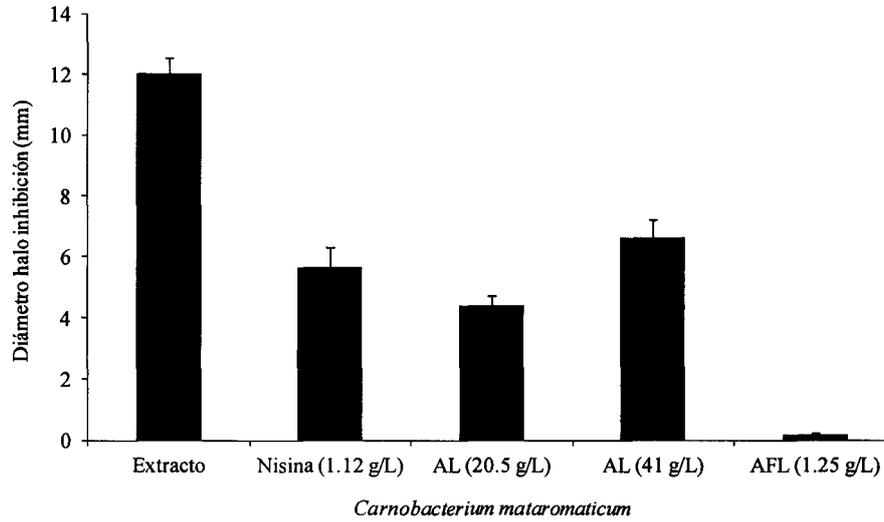
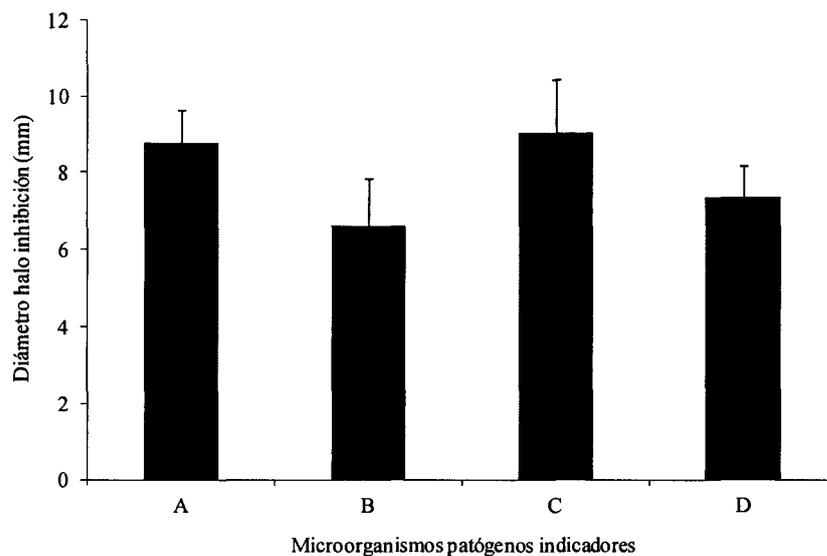


Figura 6. Diámetro de los halos de inhibición en mm producidos por el extracto antimicrobiano obtenido frente diversas cepas bacterianas patógenas: A) *Pseudomonas aeruginosa* CECT-116, B) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT-724, C) *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CECT-239 y D) *Listeria monocytogenes* CECT-934.





- ②¹ N.º solicitud: 201200456
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 03.05.2012
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BUSTOS G. et al. "Evaluation of vinification lees as a general medium for <i>Lactobacillus strains</i> " Journal of Agricultural and Food Chemistry (2004) Vol. 52, N.º. 16, páginas 5233-5239; DOI: 10.1021/jf049763m; todo el documento.	1-8
A	VÁZQUEZ S. et al. "Viabilidad del uso de suero de quesería como base del medio de cultivo de la cepa nativa probiótica <i>Lactobacillus paracasei</i> HA9-2" Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (INNOTECH) (2011) N.º. 4, páginas 10-14; recuperado de internet <URL:http://ojs.latu.org.uy/index.php/INNOTECH/article/view/43> [recuperado el 21.08.2013], todo el documento.	1-8
A	ESCOBAR L.F. et al. "Evaluación del crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> y producción de ácido láctico usando como sustrato el suero de leche de vacuno" Rev. Invest. Quindío (2010) Vol. 20, páginas 42-49; recuperado de internet <URL:http://www.uniquindio.edu.co/uniquindio/revistainvestigaciones/adjuntos/pdf/a54d_RIUQ2006.pdf> [recuperado el 21.08.2013], todo el documento.	1-8
A	VALERIO F. et al. "Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation" FEMS Microbiology Letters (05.03.2004) Vol. 233, páginas 289-295; DOI: 10.1016/j.femsle.2004.02.020; todo el documento.	1-8

Categoría de los documentos citados

- X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

- O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

- para todas las reivindicaciones para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe 23.08.2013	Examinador M. Á. García Coca	Página 1/4
------------------------------------------------	---------------------------------	---------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12P7/42 (2006.01)

C12P7/56 (2006.01)

C12R1/25 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12P, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP/ELSEVIER, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE/NLM, bases de texto completo TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.08.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-8	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-8	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	BUSTOS G. et al. "Evaluation of vinification lees as a general medium for <i>Lactobacillus</i> strains" Journal of Agricultural and Food Chemistry (2004) Vol. 52, N°. 16, páginas 5233-5239; DOI: 10.1021/jf049763m.	13.07.2004
D02	VÁZQUEZ S. et al. "Viabilidad del uso de suero de quesería como base del medio de cultivo de la cepa nativa probiótica <i>Lactobacillus paracasei</i> HA9-2" Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (INNOTEC) (2011) N°. 4, páginas 10-14; recuperado de internet <URL:http://ojs.latu.org.uy/index.php/INNOTEC/article/view/43> [recuperado el 21.08.2013].	01.01.2011
D03	ESCOBAR L.F. et al. "Evaluación del crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> y producción de ácido láctico usando como sustrato el suero de leche de vacuno" Rev. Invest. Quindío (2010) Vol. 20, páginas 42-49; recuperado de internet <URL:http://www.uniquindio.edu.co/uniquindio/revistainvestigaciones/adjuntos/pdf/a54d_RIUQ2006.pdf> [recuperado el 21.08.2013].	01.01.2010
D04	VALERIO F. et al. "Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation" FEMS Microbiology Letters (05.03.2004) Vol. 233, páginas 289-295; DOI: 10.1016/j.femsle.2004.02.020.	05.03.2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-8, es un proceso para la producción de extractos antimicrobianos a partir de suero lácteo y lías de vinificación (o vinazas) como suplemento nutricional. El proceso consta de una hidrólisis enzimática de las proteínas del suero, la adición de las lías de vinificación y la posterior fermentación por medio de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus plantarum*). Es también objeto de la invención el uso del extracto antimicrobiano obtenido en la industria alimentaria.

Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 divulga la idoneidad del uso de lías de vinificación como medio de cultivo de distintas especies del género *Lactobacillus*, ya que aportan, entre otros, compuestos nitrogenados adecuados para el crecimiento de estas bacterias. Como resultado de la fermentación se obtiene ácido láctico. En este documento también se indica que los compuestos fenólicos presentes en las lías destiladas pueden ser extraídas con solventes orgánicos, y recuperarse de esta forma para la industria alimentaria como aditivos alimentarios debido a su actividad antioxidante y antimicrobiana.

Los documentos D02 y D03 divulgan la idoneidad de la utilización de suero de quesería o suero de leche como medio de cultivo para distintas especies del género *Lactobacillus* para la producción de ácido láctico.

El documento D04 divulga la capacidad de bacterias ácido lácticas (como por ejemplo, *Lactobacillus plantarum*) de producir ácido fenil-láctico, que es, junto con otros compuestos, el responsable de su capacidad antimicrobiana. Esta propiedad antimicrobiana les hace útiles en la industria alimentaria para la preservación de alimentos.

Aunque en el estado de la técnica ya se conoce que las bacterias ácido lácticas (y más concretamente *Lactobacillus plantarum*) son capaces de producir ácido fenil-láctico, cuyas propiedades antimicrobianas son útiles en la industria alimentaria, y que son capaces de crecer en medios de cultivo tales como suero lácteo y lías de vinificación, no resultaría obvio para el experto en la materia utilizar ambos medios de forma conjunta para la producción de extractos antimicrobianos que contengan tanto ácido láctico como ácido fenil-láctico.

Por lo tanto, la invención contenida en las reivindicaciones 1-8 es con referencia a los documentos D01-D04 nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).